

01-



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PC +
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

EXPEDIENTE N° 05-59213

TITULO: COMPOSICIONES FARMACEUTICAS
MEJORADAS DE TOXINA BOTULINICA

CLASIFICACION INTERNACIONAL: A61K38/00; 381,6

SOLICITANTE: BOTULINUM TOXIN RESEARCH
ASSOCIATES, INC.

DOMICILIO: MASACHUSSETS, ESTADOS UNIDOS
DE AMERICA

APODERADO: DARIO CARDENAS NAVAS

BOGOTÁ, D.C. _____

54

R

PETITORIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación : 05059213 0000000 Folios: 73
Fecha (AMD): 2005-05-17 14:30:45
Trámite : 011 PCT-PATENT 373 FASE NACI 411 PRESENTA
Dependencia: 2029 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE

PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

20-07-05

①

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☐ Capítulo I

☒ Capítulo II

②

SOLICITANTE
(71)

Nombre: **BOTULINUM TOXIN RESEARCH ASSOCIATES, INC.**
Dirección: 1261 Furnace Brook Parkway, Quince, MA 02169, Estados Unidos de América
Nacionalidad o Domicilio: Massachussets, Estados Unidos de América
Lugar de Constitución: Estados Unidos de América
Teléfono: 3123600 Fax: 3122410
E-mail: general@cardenasycardenas.com

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☒

Cual _____
Número _____

③

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: **DARIO CARDENAS NAVAS**
Dirección: Carrera 7 No 71-52 Torre B Piso 9
Teléfono: 3123600 Fax: 3122410
E-Mail: general@cardenasycardenas.com

IDENTIFICACION

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____
No17.066.629 TP 1.250

④

INVENTOR(ES)
(72)

Nombre: Gary E. Borodic
Dirección: 90 Kennington Road, Canton, MA 02021, Estados Unidos de América
Nacionalidad o Domicilio: MASACHUSETTS, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

⑤ PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/IB2003/006145 Fecha Diciembre 22, 2003
Publicación Internacional No. WO 2004/060384 A2 Fecha Julio 22, 2004

⑥

Título(54):

COMPOSICIONES FARMACEUTICAS MEJORADAS DE TOXINA BOTULINICA

⑦

Clasificación Internacional (51):

⑧

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33)País de Origen

USA

(32)Fecha

Diciembre 20, 2002

(31)N° de Solicitud

60/435,901

⑨

Comprobante de Pago No.:

Fecha

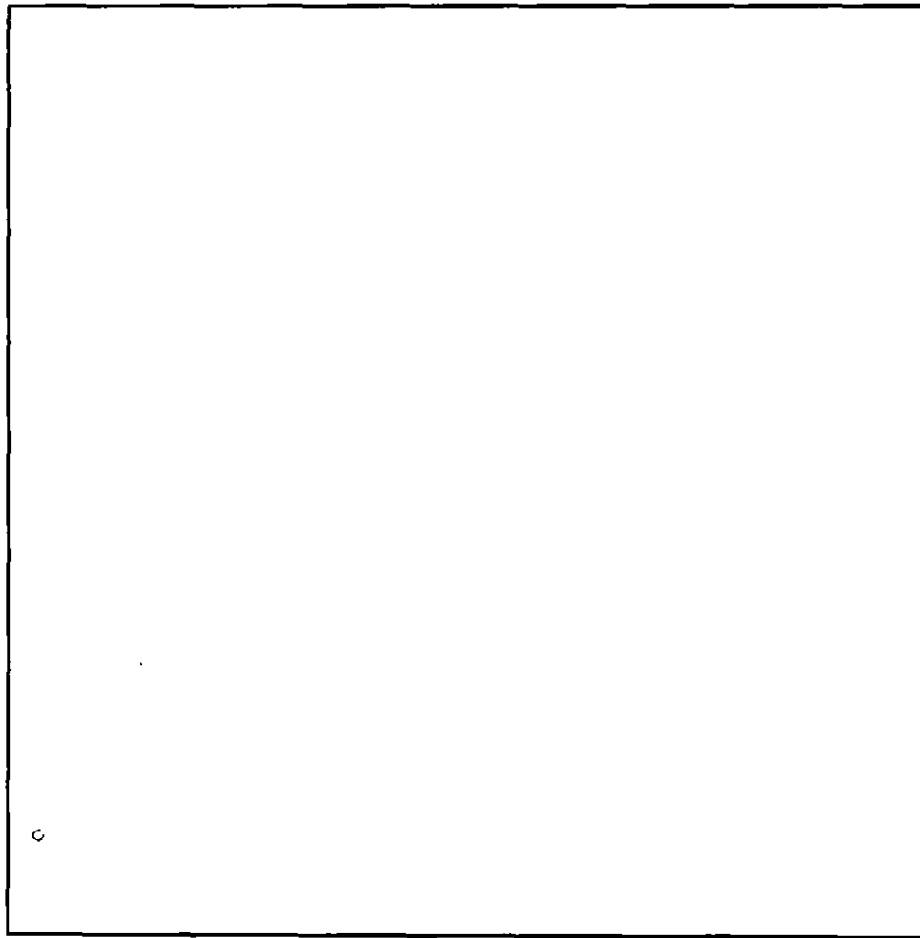
10

ANEXOS

Rec.

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. N° ~~EXP~~ OS-44,602
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☒ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☒ Arte final 12x12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☐ Otros.

11 FIGURA CARACTERISTICA



12

Solicito la Concesión de la patente,

NOMBRE: DARIO CÁRDENAS NAVAS

FIRMA:

C.C.

17.066.629

TP.

1.250

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800174089-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Radicacion : 05059213 / 00000000

Folios: 73

Fecha (GTD): 2005-06/17 14:38:45

Tramite : 011 PAT-PATENT 379 FASE HACI 411 PRESENTAC

Dependencia: 2000 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 05 - 44,602
FECHA : JUNIO 15 DE 2005

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CARDENAS Y CARDENAS P.I. CONSIGNACION		BANCO POPULAR	050-00110-6	28104303	15/06/2005	6,722,000.00
CARDENAS Y CARDENAS P.I. CONSIGNACION		BANCO POPULAR	050-00110-6	28104304	15/06/2005	1,010,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	443,000.00
	TOTAL :	\$ 443,000.00

SOM: CUATROCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

CARDENAS & CARDENAS
ABOGADOS

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
22 July 2004 (22.07.2004)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2004/060384 A2

(51) International Patent Classification⁷: A61K 38/00

SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(21) International Application Number:
PCT/IB2003/006145

Declarations under Rule 4.17:

(22) International Filing Date:
22 December 2003 (22.12.2003)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60435,901 20 December 2002 (20.12.2002) US

(71) Applicant: BOTULINUM TOXIN RESEARCH ASSOCIATES, INC. (US/US); 1261 Furness Brook Parkway, Quincy, MA 02169 (US).

(72) Inventor: BORODIC, Gary, E.; 90 Kennington Road, Canton, MA 02021 (US).

(74) Agent: STOLE, Einar, Milbank, Tweed, Hadley & McCloy LLP, International Square Building, 1825 Eye Street, N.W., Suite 1100, Washington, DC 20005 (US).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii)) for the following designations AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO patent (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

— as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii)) for the following designations AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO patent (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: IMPROVED PHARMACEUTICAL BOTULINUM TOXIN COMPOSITIONS

(57) Abstract: Botulinum toxin, a well known systemic poison, produces favorable therapeutic effect by virtue of regionally attaching to nerves within the neuromuscular junction and possibly other tissues in a target region of a particular tissue. The present invention provides compositions of botulinum toxin and a sequestration agent that increase sequestration and delivery of the botulinum toxin to neural and associated tissues, as compared with available formulations of botulinum toxins, and thereby produce a beneficial clinical effect. The sequestration agents of the present invention include proteins, lipids and carbohydrates. A preferred composition of the present invention comprises a botulinum toxin and an albumin. The present invention also provides methods of treating neuromuscular diseases and pain using the disclosed compositions and methods of making the disclosed compositions.

WO 2004/060384 A2

WO 2004/060384

PCT/IB2003/006145

Improved Pharmaceutical Botulinum Toxin Compositions

This application claims benefit to U. S. Provisional Application Serial No. 60/435,901 that was filed on December 20, 2002.

TECHNICAL FIELD OF THE INVENTION

This invention relates to improved pharmaceutical compositions comprising botulinum neurotoxin and a sequestration agent. The invention further provides pharmaceutical compositions and methods for the treatment of a variety of neuromuscular diseases.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Botulinum neurotoxin, a toxin isolated from a strain of *Clostridium botulinum*, a deadly toxin at higher concentrations and quantities, has been used as a valuable therapeutic for the treatment of many neuromuscular diseases (e.g., dystonia, hemifacial spasm, bruxism, spasticity, cerebral palsy, torticollis), as well as sensory disorders and cutaneous disorders (myofascial pain, migraine, tension headaches, neuropathy, hyperhidrosis).

Prior to this invention, the *in vivo* binding of albumin to botulinum toxin has never been identified as important to clinical effectiveness of botulinum-toxin-based pharmaceuticals. By enhancing regional sequestration of the neurotoxin and facilitating saturation of neurotoxin receptors on neural tissues, high-concentration-albumin formulations improve the clinical effectiveness of botulinum toxin and reduce side effects such as those resulting from diffusion of the botulinum toxin from the site of administration. There has been no prior suggestion that altering the formulation of botulinum toxin by increasing its concentration relative to the neurotoxin could enhance the effectiveness for the treatment of human disease. The existing botulinum toxin preparations currently available for clinical practice are BOTOX®, DYSPORT®, MYOBLOC®. The present invention identifies the mechanism and provides compositions of improved utility of botulinum-toxin-based pharmaceuticals by increasing the concentration of a sequestration agent and other viscous agents to enhance sequestration and improve the effectiveness where other available botulinum toxin preparations have failed.

In recent years, Borodic *et al.* have characterized the regional effect of botulinum toxin using muscle fiber morphometrics, cholinesterase staining, and cutaneous wrinkling

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 2004/060384

PCT/IB2003/006145

from depression of facial muscle tone. (Borodic (1992) Botulinum A toxin for (expressionistic) ptosis overcorrection after frontalis sling. *Ophthalmic Plastic and Reconstructive Surg.* 8(2): 137-142; incorporated herein by reference in its entirety).

Since its introduction as a therapeutic agent, the pharmaceutical measurement of the denervating or biologic activity of botulinum toxin has been the LD₅₀ unit using a 18-22 gram Swiss-Webster mouse, quantitated statistically by injecting cohorts of mice at different dilutions from the purified botulinum neurotoxin protein and its protein complexes. This measurement has the advantage of simplicity of a clear endpoint determination (living or dead mouse), however the LD₅₀ unit does not predict clinical behavior of various botulinum toxin formulations when compared in clinical studies. For instance, one preparation of type B botulinum toxin (MYOBLOC®) requires 5,000-15,000 LD₅₀ units to treat torticollis whereas another preparation of botulinum toxin Type A (BOTOX®) requires only 100-300 LD₅₀ units. Similarly, the LD₅₀ unit has failed to distinguish differences in therapeutic behavior of different sources of the same botulinum toxin immunotype. For instance, approximately 50-300 units of BOTOX® is required to treat blepharospasm and cervical dystonia compared to 200-1200 units of DYSPORT®, another preparation of botulinum type A toxin. Table 1 illustrates the varying doses for different diseases.

Table 1: Dosing comparisons between various pharmaceutical formulations of botulinum toxin.

Formulation	Essential Blepharospasm	Torticollis
BOTOX®	50 U ¹	200 U
DYSPORT®	200 U	600-1,200 U
MYOBLOC®	3,000-5,000 U	10,000-15,000 U

¹Units (U) are LD₅₀ units determined using 20-30 g Swiss-Webster mice, as described herein.

A. Complications Associated with Conventional Botulinum-Toxin Formulations

Beyond effective dose requirements, substantial differences in the complication rate have been noted at therapeutic quantities of different botulinum preparations. Side effects such as those resulting from diffusion of the botulinum toxin from the site of administration appear to be dependent on the formulation of botulinum toxin. For instance, dysphagia rates (difficulty swallowing) is a well-known complication of botulinum toxin administration when used for the treatment of cervical dystonia. (Borodic *et al.* (1990) Botulinum A toxin for the treatment of spasmodic torticollis. *Dysphagia and Regional Toxin Spread. Head & Neck*, 12: 392-398; incorporated herein by reference in its entirety). Differences in the rate of this

WO 2004/068384

PCT/US2003/006145

complication between formulations has been well appreciated when reviewing prior art literature between 1984-1995. Furthermore differences in the rate of ptosis have been reported when comparing various immunotypes and different preparations of the same immunotype (see Table 1). It has become well accepted that this complication is the result of diffusion of botulinum toxin away from the injection sites, a property which is in conflict with the clinical goal of containing the denervating or biologic effect to a specific target region.

Table 2: Diffusion-related complications between various pharmaceutical formulations of botulinum toxin.

Complication	BOTOX [®]	DYSPORT [™]	MYOBLOC [®]
Ptosis ¹	<2%	12-15%	30-40%
Dysphagia	<2%	14-21%	10-17%

¹Nussgens *et al.* (1997) Comparison of two botulinum-toxin preparations in the treatment of essential blepharospasm. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 235(4): 197-199.

²Phase 3 Studies 1998-1989 for Oculinum Meta-analysis of clinical studies on Dysphagia and Botulinum 1995 at NIH (Borodic).

³Lew *et al.* (1997) Botulinum toxin type B: a double-blind, placebo-controlled, safety and efficacy study in cervical dystonia. *Neurology* 49(3): 701-707.

In 1991, Borodic *et al.* demonstrated a histological model demonstrating a histochemical and morphologic diffusion gradient from point injections of botulinum toxin. (Borodic *et al.* (1991) Botulinum toxin: Clinical and scientific aspects. *Ophthalmology Clinics of North America* 4: 491-503; incorporated herein by reference in its entirety). The gradient was further demonstrated to be dose dependent over single muscle strips and capable of crossing fascial planes. The diffusion model was further demonstrated on the facial wrinkling pattern of the human forehead. (Borodic *et al.* (1992) Botulinum toxin for spasmodic torticollis, multiple vs. single point injections per muscle. *Head and Neck* 14: 33-37). Diffusion was thereafter used to explain the mechanism for dysphagia after surface injections of botulinum injection for the human neck and ptosis (drooping eyelid complication) after periocular injections for the treatment of essential blepharospasm. Ptosis results from diffusion of neuromuscular blocking activity from the lid edge to the muscular portion of the upper eyelid retractor, which lies in the upper orbital space. Dysphagia results from diffusion of neuromuscular weakening effect from the sternomastoid muscle, targeted for treatment of torticollis, to peripharyngeal musculature which generates the force for effective swallowing. From both histological models and clinical experience, diffusion appears to be directly related to the quantity of toxin given in LD₅₀ units, that is, the greater

WO 2004/060384

PCT/IB2003/006145

the LD₅₀ units used, the greater the diffusion from a point injection. From literature summary from the 1980's and early 1990's, dysphagia is more common with use of DYSPORT® than BOTOX® at effective doses. Recently, from studies done at European centers, the differences in dysphagia rates have been confirmed (Ranoux *et al.* (2002) Respective potencies of DYSPORT® and BOTOX®: a double blind, randomized, crossover study in cervical dystonia. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 72: 459-462). Differences in ptosis rates for the treatment of blepharospasm have also been observed comparing BOTOX® with DYSPORT® with BOTOX® demonstrating less common incidence of this complication (Nussgens *et al.* (1997) Comparison of two botulinum-toxin preparations in the treatment of essential Blepharospasm. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 235(4): 197-199). Major differences in the ptosis complication have been reported when using botulinum toxin type B for the treatment of glabellar and forehead wrinkles when compared to botulinum type A (BOTOX®). (Holck *et al.* Comparison of High Dose Botulinum Toxin Type B to Botulinum Type A in the Treatment of Lateral Canthal Rhytides American Society of Ophthalmic Plastic and reconstructive Surgeons Annual Meeting, Anaheim, CA 11-14-03).

B. Sequestration.

Albumin was initially used to formulate botulinum toxin based pharmaceuticals because of its stabilizing effect on the biologic activity of the neurotoxin at high dilutions (see Schantz, Botulinum Toxin Therapy, Marcel Dekker 1994). Dilution of the purified botulinum toxin crystals with physiologic saline or water would cause the biologic activity and pharmaceutical properties to be lost at high dilutions. Additionally, the albumin has been reported to help keep the neurotoxin molecule from binding to glass containers. During the pre-clinical development of BOTOX® or any other botulinum toxin prepared for pharmaceutical use, there was no appreciation for the importance of albumin in the formulation other than a dilution stabilizer and excipient to keep the neurotoxin from binding to glass.

BOTOX® and DYSPORT® are derived from different strains of Clostridial species. BOTOX® is derived from the Hall strain of *Clostridium botulinum* originally maintained by the University of Wisconsin, whereas DYSPORT® is derived from British Microbiology Collection. Immunological cross reactivity exists between the products as both products were derived from immunotype A strains. Despite similar immunotypes, the clinical responses between BOTOX® and DYSPORT® may be explained by the differences in the

excipients used in each formulation. The difference in human serum albumin concentrations between BOTOX[®] and DYSPORT[®] are outlined in Table 3.

Table 3. Human Serum Albumin content of various pharmaceutical formulations of botulinum toxin.

Formulation	Albumin ¹	LD ₅₀ /μg albumin
BOTOX [®]	500 μg	0.2
DYSPORT [®]	125 μg	5.0

¹Albumin is represented in mg per 100 LD₅₀ units of botulinum toxin. Other differences exist including the presence of stabilizing sugars. Lactose is used in DYSPORT[®] and not used in BOTOX[®].

The albumin discrepancy between BOTOX[®] and DYSPORT[®] is almost identical to the difference in dose requirements observed between BOTOX[®] and DYSPORT[®] in multiple clinical studies. The correlation between the albumin ratio/clinical potency ratio is further strengthened by changes in pharmacological properties of DYSPORT[®] when albumin is added to the vials using a mouse hemidiaphragm animal model. Wohlfahrt *et al.* noted using this model that adding albumin to one vials of DYSPORT[®] brought biologic activity higher using the mouse hemi-diaphragm model. (Biglalka *et al.* (2001) Botulinum A toxin: DYSPORT[®] improvement of biological availability. *Exp. Neurol.* 168(1): 162-170). The authors suggested the increased biologic activity resulted from increased stability as measured with the mouse LD₅₀ bioassay afforded by the albumin concentration increase. (Biglalka *et al.* (2001) Botulinum A toxin: DYSPORT[®] improvement of biological availability. *Exp. Neurol.* 168(1): 162-170). The authors explained the differences of albumin on the LD₅₀ bioassay without reference to mechanism of action in tissues or pharmacologic-pharmacokinetic importance, that is, *in vivo* albumin binding, enhanced sequestration, and improvement in therapeutic effects. The same authors further observed in a rat-diaphragm preparation, that the addition of albumin to the BOTOX[®] preparation could not substantially increase regional denervative effects and did not advocate any changes in formulation. The findings of these researchers concluded that there was an effect of the albumin concentration on the LD₅₀ measurements however, there work did not demonstrate any increased potency of BOTOX[®] on regional denervation or that DYSPORT[®] could be enhance to give any greater denervation potency over BOTOX[®]. There work was limited by

WO 2004/060384

PCT/IB2003/006145

the in vitro nature of their experiments, that is, using a non blood perfused animal dissection of a motor nerve (phrenic nerve) and diaphragm muscle, which fails to account for dilutions and tissue fluid flow capable of washing injected toxin away from targeted tissue prior to binding with the nerve axon terminal receptors. The real time application requires an in vivo analysis of the effects of albumin on regional denervation as outlined in the following experiments. Their work did identify reasons for differences in LD₅₀ as measured by the mouse lethality assay. The conclusion were no improvements in potency or effectiveness could be made over existing BOTOX® preparation and is directly contrary to the conclusion derived herein. (Hanover Germany International Botulinum Toxin Meeting 2002).

Differences in potency, issues relating diffusion and containment of the biologic effect are important in the pharmacology of botulinum-based pharmaceuticals. Described herein is a method for altering compositions of botulinum based pharmaceuticals to enhance potency, increase sequestration of the botulinum toxin and limit adverse effects of botulinum-based pharmaceuticals.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides a composition comprising botulinum toxin and a sequestration agent for use in treating various neuromuscular diseases and localized denervation. In one embodiment, the sequestration agent is present in an amount between 550 and 550,000 µg sequestration agent per 100 LD₅₀ units botulinum toxin. In another embodiment, the sequestration agent is present in an amount between 550 and 5,500 µg sequestration agent per 100 LD₅₀ units botulinum toxin. In a further embodiment, the sequestration agent is present in an amount between 5,500 and 13,000 µg sequestration agent per 100 LD₅₀ units botulinum toxin. In a preferred embodiment, the sequestration agent is present in an amount between 13,000 and 50,500 µg sequestration agent per 100 LD₅₀ units botulinum toxin. In a more preferred embodiment, the sequestration agent is present in an amount between 50,500 and 505,000 µg sequestration agent per 100 LD₅₀ units botulinum toxin. In the most preferred embodiment, the sequestration agent is formulated as encapsulated microspheres in an amount between 50,500 and 90,500 µg sequestration agent per 100 LD₅₀ units botulinum toxin.

In another embodiment, the present invention provides a composition comprising botulinum toxin and a sequestration agent, wherein the sequestration agent is present in an

WO 2004/060384

PCT/IB2003/006145

amount between 550 and 900,500 μg sequestration agent per 100 LD_{50} units botulinum toxin, wherein the albumin may be formulated as a solid albumin particle.

The botulinum toxin of the present compositions may be selected from a variety of strains of *Clostridium botulinum*. In a preferred embodiment, the compositions of the present invention comprises a botulinum toxin selected from the group consisting of botulinum toxin types A, B, C, D, E, F and G. In a preferred embodiment, the botulinum toxin is botulinum toxin type A. In a more preferred embodiment, the botulinum toxin is botulinum toxin type A from the Hall strain of *Clostridium botulinum*.

In another embodiment, the compositions of the present invention comprise a botulinum toxin that consists essentially of fractionated-light-chain botulinum toxin. In yet another embodiment, the botulinum toxin consists essentially of a mixture of hybrid and chain-translocated forms of botulinum toxin. In a further embodiment, the botulinum toxin consists essentially of chimeric forms of botulinum toxin. Although the present invention may utilize any botulinum toxin, botulinum toxin fragment that retains neurotoxic activity, botulinum toxin chimeras and hybrids, chemically-modified botulinum toxin, and specific activities well known to those of ordinary skill in the art, in one embodiment the botulinum toxin is purified to a specific activity greater than or equal to about 20 LD_{50} units per nanogram botulinum toxin.

The present invention provides compositions of botulinum toxin and a sequestration agent wherein the ratio of LD_{50} units of botulinum toxin to μg sequestration agent is less than or equal to about 0.2 for botulinum toxin type A and is less than or equal to about 10 for botulinum toxin type B.

Each composition of the present invention, in addition to comprising a botulinum toxin and a sequestration agent, may further comprise a pharmaceutically acceptable carrier and/or zinc and/or a zinc salt. In one embodiment, the botulinum toxin is noncovalently bound to the a sequestration agent. In another embodiment, the botulinum toxin is covalently bound to the sequestration agent.

The present invention provides compositions of a botulinum toxin and a sequestration agent, wherein the sequestration agent is selected from the group consisting of: proteins, lipids and carbohydrates. In a preferred embodiment, the sequestration agent is albumin,

WO 2004/068384

PCT/IB2003/006145

collagen, epinephrine or hyaluronate. In a more preferred embodiment, the sequestration agent is hyaluronate. In the most preferred embodiment, the sequestration agent is albumin.

The present invention further provides compositions comprising a botulinum toxin and a sequestration agent, wherein the sequestration agent is an albumin, preferably human serum albumin. Furthermore, in one embodiment, the albumin of the present compositions is recombinantly produced. In one embodiment, the albumin is present in an amount between 550 and 5,500 μg albumin per 100 LD₅₀ units botulinum toxin. In a further embodiment, albumin is present in an amount between 5,500 and 13,000 μg albumin per 100 LD₅₀ units botulinum toxin. In a preferred embodiment, albumin is present in an amount between 13,000 and 50,500 μg albumin per 100 LD₅₀ units botulinum toxin. In a more preferred embodiment, albumin is present in an amount between 50,500 and 505,000 μg albumin per 100 LD₅₀ units botulinum toxin. In a most preferred embodiment, albumin is formulated as encapsulated microspheres in an amount between 50,500 and 90,500 μg albumin per 100 LD₅₀ units botulinum toxin.

In one embodiment of the present invention, the compositions comprise a botulinum toxin and at least one sequestration agent. In a preferred embodiment, the compositions of the present invention comprising a botulinum toxin and albumin and further comprising one or more additional sequestration agents.

The present invention also provides methods of producing localized denervation in a subject in need thereof, comprising administering an effective amount of any of the compositions of the present invention that are described herein. In one embodiment, the methods of the present invention are used to produce denervation in a subject that suffers from a neuromuscular disease associated with increased muscle tone with involuntary movement. In another embodiment, the methods of the present invention are used to produce denervation in a subject that suffers from a neuromuscular disease. Preferably, the neuromuscular disease is characterized by increased muscle tone and/or involuntary movement, including but not limited to dystonias, spinal cord injury or disease, multiple sclerosis, spasticity, cerebral palsy, stroke, and the like. Preferably, the neuromuscular disease associated with increased muscle tone and/or involuntary movement is blepharospasm or torticollis. More preferably, the neuromuscular disease associated with increased muscle tone with involuntary movement is blepharospasm.

WO 2004/060384

PCT/IB2003/006145

13

In one embodiment, the present invention provides methods for producing denervation in a subject suffering from blepharospasm comprising administering between 10-200 LD₅₀ units of a composition of the present invention, as described herein. In another embodiment, the present invention provides methods for producing denervation in a subject suffering from torticollis. Preferably, the effective amount of a composition of the present invention is between 10 and 3000 LD₅₀ units.

In another embodiment, the present invention provides a method of treating a condition selected from the group consisting of facial wrinkles, rhytides and cosmetic alteration of lip and brow, in a subject in need thereof, comprising administering an effective amount of a composition of the present invention, as disclosed herein. Preferably, the effective amount is between 2.5 and 400 LD₅₀ units.

In yet another embodiment, the present invention provides a method of treating human headache disorders in a subject in need thereof, comprising administering an effective amount of a composition of the present invention, as disclosed herein. Preferably, the effective amount is between 5 and 1000 LD₅₀ units.

In a further embodiment, the present invention provides a method of treating human migraine headache disorders in a subject in need thereof, comprising administering an effective amount of a composition of the present invention, as disclosed herein. Preferably, the effective amount is between 5 and 1,000 LD₅₀ units.

The present invention also provides a method of treating human inflammatory conditions in a subject in need thereof, comprising administering an effective amount of a composition of the present invention, as disclosed herein. Preferably, the effective amount is between 5 and 4,000 LD₅₀ units.

The present invention also provides a method of treating myopathic or neuropathic pain in a subject in need thereof, comprising administering an effective amount of a composition of the present invention, as disclosed herein. Preferably, the effective amount is between 5 and 4,000 LD₅₀ units.

The present invention also provides a method of treating back pain or arthritic pain in a subject in need thereof, comprising administering an effective amount of a composition of

WO 2004/060384

PCT/IB2003/006145

the present invention, as disclosed herein. Preferably, the effective amount is between 5 and 4,000 LD₅₀ units.

In yet another embodiment, the present invention provides a method of treating gastrointestinal spasm and strictures in a subject in need thereof, comprising administering an effective amount of a composition of the present invention, as disclosed herein. Preferably, the effective amount is between 5 and 4,000 LD₅₀ units.

The present invention provides a method of treating a hyperthyroidism syndrome in a subject in need thereof, comprising administering an effective amount of a composition of the present invention, as disclosed herein. Preferably, the effective amount is between 5 and 4,000 LD₅₀ units.

The present invention also provides a method of producing the compositions described herein. In one embodiment, the method comprises mixing a sequestration agent with botulinum toxin. In another embodiment, the method comprises freeze drying or flash drying a sequestration agent with botulinum toxin. Preferably, the botulinum toxin and the sequestration agent are in a weight to weight ratio which exceeds 100 µg sequestration agent to 1 mg of botulinum toxin.

The present invention also provides a use of any of the compositions disclosed herein for the treatment of a neuromuscular disease, pain, inflammatory conditions, facial wrinkles, rhytides, cosmetic alteration of lip and brow, and the like. The present invention also provides a use of any of the compositions disclosed herein for the preparation of a medicament for the treatment of a neuromuscular disease, pain, inflammatory conditions, facial wrinkles, rhytides, cosmetic alteration of lip and brow, and the like.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention describes a method and composition to enhance the clinical effectiveness of botulinum-toxin preparation for clinical use by means of increasing sequestration of botulinum neurotoxin molecules in the region of the human or mammalian body targeted for therapy through the use of a sequestration agent or "molecular anchor". Enhanced sequestration using higher concentration of macromolecules such as proteins (e.g., albumin, collagen and the like), and/or lipids and/or polysaccharides (e.g., hyaluronate, and the like) can be useful to provide a molecular anchor to neurotoxin molecules preventing

WO 2004/060384

PCT/IB2003/006145

diffusion away from the injection point, causing maximal saturation of botulinum neurotoxin receptors, thereby achieving greater efficacy with the amount of neurotoxin used to achieve desired clinical effects. The sequestration agent enhances containment of regional denervation, and enhances clinical outcomes. The increased sequestration allows for better delivery to nerve ending, with enhanced uptake and augmentation of denervative and other biologic effects. The invention requires a sequestration agent added to a formulation of neurotoxin which binds to the neurotoxin, prevents dissemination of the neurotoxin and demonstrates improvement in clinical response, in patients who were previously treated without the carrier molecule at preferred concentrations. The sequestration agent may be an existing excipient at significantly higher concentrations than previously used (such as human serum albumin), or a material that has not been previously used to stabilize botulinum toxin (such as sodium hyaluronate). The sequestration agent must bind to the botulinum toxin molecule and prevents its diffusion so that the neurotoxin may react with the nerve-terminal ending or any neural structure so that effectiveness of the therapy is improved.

A. Definitions

As used herein, "Botulinum toxin" means a protein toxin and its complexes isolated from strains of *Clostridium botulinum*, including various immunotypes such as A, B, C1, C2, C3, D, E, F and G.

As used herein, "an effective amount" is an amount sufficient to produce a therapeutic response. An effective amount may be determined with dose escalation studies in open-labeled clinical trials or bin studies with blinded trials.

As used herein "neuromuscular diseases" refer to any disease adversely affecting both nervous elements (brain, spinal cord, peripheral nerve) or muscle (striated or smooth muscle), including but not limited to involuntary movement disorders, dystonias, spinal cord injury or disease, multiple sclerosis, spasticity, cerebral palsy, and stroke.

As used herein, the term "neuromuscular diseases" refer to any disease adversely affecting both nervous elements (brain, spinal cord, peripheral nerve) or muscle (striated or smooth muscle), including but not limited to involuntary movement disorders, dystonias, spinal cord injury or disease, multiple sclerosis, spasticity, cerebral palsy, and stroke.

WO 2004/060384

PCT/IB2003/006145

As used herein, the term "pharmaceutically acceptable carrier" means a chemical composition, compound, or solvent with which an active ingredient may be combined and which, following the combination, can be used to administer the active ingredient to a subject. As used herein, "pharmaceutically acceptable carrier" includes, but is not limited to, one or more of the following: excipients; surface active agents; dispersing agents; inert diluents; granulating and disintegrating agents; binding agents; lubricating agents; preservatives; physiologically degradable compositions such as gelatin; aqueous vehicles and solvents; oily vehicles and solvents; suspending agents; dispersing or wetting agents; emulsifying agents; demulcents; buffers; salts; thickening agents; fillers; antioxidants; stabilizing agents; and pharmaceutically acceptable polymeric or hydrophobic materials and other ingredients known in the art and described, for example in Genaro, ed., 1985, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., which is incorporated herein by reference.

As used herein, "sequestration agent" means an agent that enhances localization and/or retention of the botulinum toxin to the site of administration.

As used herein, "subject" means a mammal.

B. Albumin.

Endogenous human serum albumin binds native circulating molecules, such as free fatty acids, bilirubin, hormones and zinc. Additionally, circulating human albumin can bind with many pharmaceutical agents which can influence potency, complication rate, clearance, and other pharmacodynamic properties of these agents. Examples include salicylates, sulfisoxazoles, warfarin, phenylbutazone, digtoxin, phenytoin, oxacillin, benzylpenicillin, lasix, indomethacin, diazepam, and quindine among others. Peptides and proteins also are known to bind human serum albumin. Peptide hormones such as gastrin, corticotropin, melatonin are also known to bind human serum albumin.

Several binding sites have been identified and binding has been thought to be non-covalent. Additionally, albumin can non-covalently bind cations that serve as cofactors for enzymatic reactivity of portions of the botulinum toxin polypeptide complex. Specifically, zinc is a cofactor for the endopeptidase activity of the botulinum toxin light chain which enters the target cells after heavy chain binding to the cell surface protein receptors. Higher quantities of zinc bound to albumin enhance endopeptidase activity. Zinc binding to albumin

WO 2004/060384

PCT/IB2003/006145

is dose dependent. Saturation of zinc binding on albumin enhances the denervating effect of botulinum toxin.

Albumin, because of larger atomic mass and other protein properties, is physiologically cleared from the injection area by lymph vessel absorption, not blood vessel absorption), a process which is much slower than removal of smaller molecular species. The relevance to Botulinum toxin pharmaceuticals relates to the role both in maintaining biologic activity by promoting nerve contact and preventing wash out from free neurotoxin release at injection points. DYSPORT[®], with its lower albumin concentration, offers less sequestration for the neurotoxin complex, and subsequently, after injected, diffusion away from the targeted anatomic area are results. The clinical effect is a greater regional diffusion of the chemodenervation, which results in increased complications (ptosis, Dysphagia see Table 2). In order to compensate for this biologic behavior, the clinicians in practice or studies have had to give four to five times as much neurotoxin to achieve the same degree of biologic activity as a higher albumin concentration. With less potent immunotypes such as botulinum toxin type B (MYOBLOC[®]), larger doses are needed to achieve the same regional bioeffect, hence further diffusion occurs with increased complication rates (see Table 2). Administering more botulinum toxin (higher protein load) results in higher immunity rates after repeated injections. (Borodic *et al.* (1996) Botulinum Toxin, Immunology and Problems with Available Materials. *Neurology* 46: 26-29).

MYOBLOC[®] is formulated at an acidic pH <6.0 which provides for increased stability and stability of the liquid formulation at room temperature. Unfortunately, the acidic pH has an adverse side effect on the structure and probably tissue carrying properties of the human serum albumin in this biologic drug's formulation. At varying pH, the isomerization of albumin can be considerable as well as the tertiary configuration of the albumin protein and physical properties (see Peters (1996) All about Albumin. Academic Press, New York; incorporated herein by reference in its entirety). Alterations in physical properties (via changes in binding of botulinum toxin and dynamics of botulinum toxin molecular release in tissues) can be used to explain some of the considerable differences in dose requirements comparing BOTOX[®] and MYOBLOC[®] in clinical practice. With higher pH, type B formulation, similar histological effects can be seen with equivalent LD₅₀ units (see Borodic *et al.* (1993) Botulinum B Toxin as an Alternative to Botulinum A Toxin, A Histological study. *Ophthalmic Plastic and Reconstructive Surgery* 9(3): 182-190).

WO 2004/064384

PCT/IB2003/006145

Although other proteins (e.g. gelatin, lactalbumin, lysozyme), lipids and carbohydrates may serve as effective sequestration agents, albumin, including encapsulated albumin and solid microspheres is the preferred protein sequestration agent, in part, because of its low immunogenicity.

C. Sequestration.

The concept of sequestration has been used by the inventor to explain altered lidocaine toxicity when periocular injections are given in the absence of Wydate. (Troll *et al.* (1999) Diplopia after cataract surgery using 4% lidocaine in the absence of Wydate™. *Clin Anesth.* 11(7): 615-6). Sequestration, in the absence of Wydate, of injectable lidocaine in this circumstance causes toxicity of myofibrils of the extra-ocular muscles with contraction scarring and damage to extra-ocular movement. The lidocaine example indicates how sequestration from dynamic diffusion of an injectable drug can be important to the drug's basic pharmacology.

There has, however, never been a suggestion or recommendation that albumin can alter regional denervation potency or enhance clinical effects or be used to treat patients not responding to BOTOX®, DYSPORT® or MYOBLOC®. The present invention provides compositions and methods that enhance the clinical effectiveness of botulinum toxin pharmaceuticals.

As pointed out in the potency section above, sequestration—the regional containment of chemodenervation—is one of the most important properties of the formulations of the present invention. The property is important in enhancing potency, reducing the complication rate from diffusion, and reducing antigenicity of the botulinum toxin. Preparations which require higher dosing, that is administration of an increased protein load, are associated with higher rates of immunity (comparing 79-11 original Oculinum Batch to current BOTOX® Batch, MYOBLOC® compared to BOTOX®). Enhanced sequestration allows for lower protein load, less diffusion, and enhanced biologic effect within the region targeted for treatment. The utility of this improved composition is demonstrated by its therapeutic effectiveness when conventional formulations (e.g., BOTOX®, MYOBLOC®) currently in use have failed or given suboptimal results.

WO 2004/060384

PCT/IB2003/006145

19

D. Dosing of High-Albumin Formulations of Botulinum Toxin

Producing compositions of botulinum toxin that require a lower effective amount to treat a particular condition is desired, because the administration of botulinum toxin has been associated with the development of immunological resistance. Consequently, this complication requires increased dosing (higher LD₅₀ units) to achieve a therapeutically-effective amount of the botulinum toxin.

A composition of Hall-strain-derived botulinum toxin was formulated with a specific activity of 20 LD₅₀ units/μg toxin and 900 μg human serum albumin to 100 LD₅₀ units of botulinum toxin (0.11 LD₅₀ unit/μg albumin) (US FDA IND 4891). The indication for therapy for this new formulation was aberrant regeneration of the facial nerve with involuntary synkinetic blepharospasm. The study was conducted using between 5 and 15 LD₅₀ units of botulinum type A toxin formulated with the increased amount of albumin to LD₅₀ content.

Table 5: Reduction in effective amount of botulinum toxin using high-albumin botulinum toxin compositions.

Open-Label Trials	15 patients each receiving 5-15 LD ₅₀ units	100% demonstrated decreased involuntary movement	No ptosis complication
Double-Blind Placebo Controlled Trials	30 patients (ratio 1:1 treatment/control) each receiving 15 LD ₅₀ units	1. Degree of involuntary movements significantly better than controls. 2. Subjective parameters significantly better than controls	No ptosis complications

Prior literature has indicated that existing BOTOX[®] preparations require 20 LD₅₀ units to achieve favorable results for this indication. (Borodic *et al.* (1993) Botulinum Toxin for aberrant facial nerve regeneration. Dose response relationships. *Plastic and Reconstructive Surgery*, (91)6: 1042-1045. 1993). Furthermore, there has been a 20% incidence of ptosis (a diffusion complication) associated with the use of botulinum toxin for involuntary blepharospasm, based on a 100 patient study on BOTOX[®] for the treatment of blepharospasm and using comparable LD₅₀ doses (see new batch approval study from Allergan Pharmaceuticals, 1998; incorporated herein by reference in its entirety). Comparing the incidence of this complication in the high-albumin study shown above with the BOTOX[®] equivalency study (19/99, compared to 0/30, P<0.01, Chi Square), it appears that the high-

19

WO 2004/060384

PCT/IB2003/006145

20

albumin type A botulinum toxin composition required fewer LD₅₀ units to achieve acceptable therapeutic results (reduction in effective amount of toxin) and was associated with limited diffusion into the orbit which frequently results in ptosis. The decreased incidence of this complication indicated sequestration of the effects of botulinum toxin was enhanced by the higher albumin content.

EXAMPLES

The following Examples serve to further illustrate the present invention and are not to be construed as limiting its scope in any way.

Example 1: Treatment of blepharospasm.

The subject is a 52-year-old female with severe bilateral involuntary blepharospasm. Involuntary movements have prevented her from driving and maintaining gainful employment. BOTOX® was administered by injection on five separate occasions without producing any significant clinical improvement. Surgery was performed to remove a portion of the protractors of eyelid closure (orbicularis oculi). No lasting improvement was observed.

The albumin content of the BOTOX® was altered by adding 5,000 µg human serum albumin to a vial of BOTOX® (100 LD₅₀ units). The resulting composition has an albumin concentration of 2,750 µg/cc (0.018 LD₅₀/µg albumin). Administration of 60 LD₅₀ units of the high-albumin preparation produced a nearly complete resolution of symptoms. The high-albumin concentration was clinically effective even when used in subsequent administrations (4 injection cycles) for over two years.

Example 2: Treatment of hemifacial spasm.

The subject is a 62-year-old male with a history of bilateral hemifacial spasm. Botulinum-toxin therapy using BOTOX® had been ineffective. The spasms impaired his day to day ability to function. Decompression of a facial nerve was attempted surgically on two separate occasions. Both surgeries proved ineffective in attaining acceptable relief of involuntary facial spasms and produced deafness in one ear.

The albumin content of the BOTOX® was increased by adding human serum albumin sufficient to achieve a concentration of 5,250 µg/cc (0.00952 LD₅₀/µg albumin).

WO 2004/060384

PCT/IB2003/006145

21

Administration of 30 LD₅₀ units of the high-albumin preparation proved highly effective and substantially relieved the clinical symptoms.

Example 3: Treatment of hemifacial spasm.

The subject is a 66-year-old man with right hemifacial spasm. Although he was successfully treated with BOTOX® for 11 years, resistance developed that rendered further injections ineffective. Resistance-resistance testing, using a remote point injection, demonstrated an absence of circulating antibody. A trial of another botulinum toxin formulation, MYOBLOC®, was also ineffective at relieving signs and symptoms.

The albumin content of BOTOX® was increased by adding human serum albumin sufficient to achieve a concentration of 5,250 µg/cc (0.00932 LD₅₀/µg albumin). Administration of 40 LD₅₀ units of the high-albumin preparation proved highly effective and substantially relieved the clinical symptoms.

Example 4: Treatment of benign essential blepharospasm.

The subject is a 72-year-old university president who was diagnosed with benign essential blepharospasm. Four prior injections of the standard BOTOX® preparation failed to achieve any significant improvement. The subject was referred for possible surgical removal of muscle and nerve to weaken muscles necessary for eyelid closure. Instead, a high-albumin preparation of botulinum toxin was administered to the usual injection sites that are specific for benign essential blepharospasm. The high-albumin preparation was produced by adding 12,250 µg/cc (0.004 LD₅₀/µg albumin). Administration of 60 LD₅₀ units of the high-albumin preparation achieved excellent results when the administration of the conventional BOTOX® formulation had failed. Three months after the initial administration of the high-albumin botulinum toxin preparation, 40 LD₅₀ units of a high-albumin preparation comprising 25,000 µg albumin per 100 LD₅₀ units (0.002 LD₅₀/µg albumin) were administered and produced greater than 80% relief of the clinical symptoms of blepharospasm.

Example 5: Treatment of blepharospasm.

The subject is a 67-year-old female with blepharospasm that was not responsive to BOTOX® injections. Surgical removal of nerve and muscle failed to provide any relief from involuntary eyelid closures.

21

WO 2004/060384

PCT/IB2003/006145

22

Albumin was added to a conventional BOTOX[®] preparation to produce a high-albumin preparation of botulinum toxin with a concentration of 50,250 µg albumin/cc (0.001 LD₅₀/µg albumin). Injection of 50 units the high-albumin preparation produced a greater than 50% reduction of symptoms.

Example 6: Treatment of blepharospasm.

The subject is a 77-year-old male who noted tachyphylaxis following repeated botulinum toxin injections. Conventional formulations of botulinum toxin type B were injected without relief of blepharospasm.

Human serum albumin and 0.5 cc Healon[®] (hyaluronate) were both added to a 100 LD₅₀ units of botulinum toxin type A (BOTOX[®]). The high-albumin preparation produced contained 25,500 µg albumin per 100 LD₅₀ units (0.005 LD₅₀/µg albumin). Administration of 60 LD₅₀ units reduced the clinically-observed involuntary-eyelid contractions.

Example 7: Treatment of essential blepharospasm.

The subject was a 66-year-old female with essential blepharospasm. Repeated treatment with BOTOX[®] (type A), using a range between 40 to 300 LD₅₀ units, produced no therapeutic benefit. Botulinum toxin type B (MYOBLOC[®]) was administered at a dose of 10,000 LD₅₀ units within the periorcular region and also failed to produce any relief. Bilateral-facial neurectomy also failed to produce any substantial relief of symptoms. Additional surgical procedures to remove muscles necessary for eyelid closure were similarly ineffective.

Human serum albumin was added to a 100 LD₅₀ units of botulinum toxin type A (BOTOX[®]). The high-albumin preparation produced contained 12,750 µg albumin per 100 LD₅₀ units (0.00196 LD₅₀/µg albumin). Administration of 50 LD₅₀ units produced substantial relief of symptoms for a period of three to four months, when other formulations and surgical approaches had failed.

Example 8: Treatment of severe chronic blepharospasm.

The subject is an 83-year-old male with severe chronic blepharospasm. The subject had developed ptosis, a diffusion side effect, after repeated treatments with therapeutic doses of conventional botulinum toxin formulations. The emergence of ptosis complicated the

WO 2004/060384

PCT/IB2003/006145

23

treatment of this subject by requiring lower doses of botulinum toxin. The lower dosing proved less effective.

The patient received an a high-albumin formulation of botulinum toxin that was produced by mixing 25,000 μ g human serum albumin 100 LD₅₀ units of BOTOX[®]. The high-albumin preparation contained 12,750 μ g albumin per cc (0.004 LD₅₀/ μ g albumin). Using the high-albumin preparation, 60-70 LD₅₀ units were administered with excellent clinical results and no evidence of ptosis after the therapy. The enhanced sequestration of much higher concentrations of botulinum toxin depressed the spread of the neurotoxin into the muscles within the eye socket.

Example 9: Treatment of essential blepharospasm.

The subject is a 67-year-old woman with essential blepharospasm. The subject underwent treatment with conventional formulations of botulinum toxin without relief. In addition, these treatments produced ptosis.

A high-albumin botulinum toxin composition (20,000 μ g albumin per cc; 0.0025 LD₅₀ BOTOX[®]/ μ g albumin) was administered to the subject with a resultant clinical improvement of the blepharospasm and no diffusion-related side effects (ptosis).

Table 4: Comparison of albumin concentrations used in Examples 1-9 with other formulations.

Example	Albumin Concentration (μ g/cc)	High-Albumin Preparation (LD ₅₀ / μ g albumin/cc)	BOTOX [®] (LD ₅₀ / μ g albumin/cc)	DYSPORT [®] (LD ₅₀ / μ g albumin/cc)	MYOBLOC [®] (LD ₅₀ / μ g albumin/cc)
1	2,750	0.0180	0.2	5	10
2	5,250	0.0095	0.2	5	10
3	5,250	0.0095	0.2	5	10
4	12,500	0.0040	0.2	5	10
	25,000	0.0020			
5	50,250	0.0001	0.2	5	10
6*	10,200	0.0050	0.2	5	10

23

WO 2004/060384

PCT/IB2003/006145

7	25,000	0.0020	0.2	5	10
8	12,500	0.0040	0.2	5	10
9	20,000	0.0025	0.2	5	10

LD₅₀/mg albumin/cc for BOTOX®, DYSPORT®, MYOBLOC® given for direct comparison

Example 10: Preparation of a high-albumin composition of botulinum toxin.

After quantitating the biologic effect by dilution of purified botulinum toxin, a quantity of albumin is added to the lyophilized material in a quantity sufficient to exceed 500 mg per 100 LD₅₀. The increased albumin binds to botulinum toxin and enhances sequestration of the injected neurotoxin providing for better saturation of neurotoxin receptors and improved clinical effect.

Example 11: Preparation of a high-albumin composition of botulinum toxin further comprising hyaluronate.

After quantitating the biologic effect by dilution of purified botulinum toxin, a quantity of albumin is added to the lyophilized material in a quantity sufficient to exceed 500 µg per 100 LD₅₀ units. Additionally, another sequestration agent, which further enhances sequestration, is added to keep the botulinum neurotoxin from diffusing away from the injections site. Such a sequestration agent includes but is not limited to a diluted solution of sodium hyaluronate. The increased albumin non-covalently binds to botulinum toxin and enhances the sequestration of the neurotoxin providing better saturation of neurotoxin receptors and, consequently, an improved clinical effect.

Example 12: Preparation of a high-albumin composition of botulinum toxin further comprising collagen.

After quantifying the denervating effect of a botulinum neurotoxin by dilution of a purified botulinum toxin, albumin is mixed with the lyophilized botulinum neurotoxin in a quantity sufficient to exceed 500 µg albumin per 100 LD₅₀ units. Additionally, another physical agent, which further enhances sequestration, is added to keep botulinum neurotoxin from diffusing away from the injections field. Such an agent would be a diluted mixture of animal or human collagen. The increased albumin non-covalently binds to botulinum toxin and enhances to the sequestration of the neurotoxin proving better saturation of neurotoxin receptors and improved clinical effect.

WO 2004/060384

PCT/IB2003/006145

25

Example 13: Preparation of a high-albumin composition of botulinum toxin comprising a recombinantly-produced botulinum toxin-albumin fusion protein.

Botulinum toxin is produced as a fusion protein with albumin thereby producing an albumin molecule that is covalently linked to a botulinum toxin. The fusion protein is tested using the mouse LD₅₀ bioassay to determine the effective amount. The regional denervation rabbit ptosis bioassay and mouse hindlimb bioassay may be used to confirm the effective amount of a composition comprising the fusion protein. A clinical-dose-escalation study would be further used to confirm and refine effective amount.

25

WO 2004/060384

PCT/IB2003/006145

26

1. A composition comprising botulinum toxin and a sequestration agent, wherein the sequestration agent is present in an amount between 550 and 550,000 μg sequestration agent per 100 LD₅₀ units botulinum toxin.
2. The composition of claim 1, wherein the sequestration agent is present in an amount between 550 and 5,500 μg sequestration agent per 100 LD₅₀ units botulinum toxin.
3. The composition of claim 1, wherein the sequestration agent is present in an amount between 5,500 and 13,000 μg sequestration agent per 100 LD₅₀ units botulinum toxin.
4. The composition of claim 1, wherein the sequestration agent is present in an amount between 13,000 and 50,500 μg sequestration agent per 100 LD₅₀ units botulinum toxin.
5. The composition of claim 1, wherein the sequestration agent is present in an amount between 50,500 and 505,000 μg sequestration agent per 100 LD₅₀ units botulinum toxin.
6. The composition of claim 1, wherein the sequestration agent is formulated as encapsulated microspheres in an amount between 50,500 and 90,500 μg sequestration agent per 100 LD₅₀ units botulinum toxin.
7. The composition of claim 1, wherein the botulinum toxin is selected from the group consisting of: botulinum toxin types A, B, C, D, E, F and G.
8. The composition of claim 7, wherein the botulinum toxin is botulinum toxin type A from Hall strain *Clostridium botulinum*.
9. The composition of claim 1, wherein the botulinum toxin comprises fractionated-light-chain botulinum toxin.
10. The composition of claim 1, wherein the botulinum toxin consists essentially of fractionated light chain botulinum toxin.
11. The composition of claim 1, wherein the botulinum toxin consists essentially of a mixture of hybrid and chain-translocated forms of botulinum toxin.

26

WO 2004/060384

PCT/IB2003/006145

27

12. The composition of claim 1, wherein the botulinum toxin consists essentially of chimeric forms of botulinum toxin.
13. The composition of claim 1, wherein the botulinum toxin has a specific activity greater than or equal to 20 LD₅₀ units per nanogram botulinum toxin.
14. The composition of claim 1, wherein the ratio of LD₅₀ units of botulinum toxin to µg sequestration agent is less than or equal to 0.2 for botulinum toxin type A.
15. The composition of claim 1 wherein the ratio of LD₅₀ units of botulinum toxin to µg sequestration agent is less than or equal to 10 for botulinum toxin type B.
16. The composition of claim 1 further comprising a pharmaceutically acceptable carrier.
17. The composition of claim 1, wherein the botulinum toxin is noncovalently bound to the sequestration agent.
18. The composition of claim 1, wherein the botulinum toxin is covalently bound to the sequestration agent.
19. A composition of claim 1 further comprising zinc or a zinc salt.
20. The composition of claim 1, wherein the sequestration agent is albumin.
21. The composition of claim 1, wherein albumin is present in an amount between 550 and 5,500 µg albumin per 100 LD₅₀ units botulinum toxin.
22. The composition of claim 1, wherein albumin is present in an amount between 5,500 and 13,000 µg albumin per 100 LD₅₀ units botulinum toxin.
23. The composition of claim 1, wherein albumin is present in an amount between 13,000 and 50,500 µg albumin per 100 LD₅₀ units botulinum toxin.
24. The composition of claim 1, wherein albumin is present in an amount between 50,500 and 505,000 µg albumin per 100 LD₅₀ units botulinum toxin.

27

WO 2004/060384

PCT/IB2003/006145

28

25. The composition of claim 1, wherein albumin is formulated as encapsulated microspheres in an amount between 50,500 and 90,500 μg albumin per 100 LD₅₀ units botulinum toxin.
26. The composition of claim 1, wherein the albumin is formulated as a solid albumin particle.
27. The composition of claim 1, wherein the albumin is recombinantly produced.
28. The composition of claim 20 further comprising one or more additional sequestration agents.
29. The composition of claim 1, wherein the sequestration agent is selected from the group consisting of: proteins, lipids and carbohydrates.
30. The composition of claim 29, wherein the sequestration agent is collagen.
31. The composition of claim 29, wherein the sequestration agent is hyaluronate.
32. The composition of claim 29, wherein the sequestration agent is epinephrine.
33. A method of localized denervation in a subject in need thereof, comprising administering an effective amount of the composition of claim 1.
34. The method of claim 33, wherein the subject suffers from a neuromuscular disease associated with increased muscle tone or involuntary movement.
35. The method of claim 34, wherein the neuromuscular disease associated with increased muscle tone with involuntary movement is blepharospasm or torticollis.
36. The method of claim 35, wherein the neuromuscular disease associated with increased muscle tone with involuntary movement is blepharospasm.
37. The method of claim 36, wherein the effective amount is between 10-200 LD₅₀ units.
38. The method of claim 35, wherein the neuromuscular disease associated with increased muscle tone with involuntary movement is torticollis.

28

WO 2004/060384

PCT/IB2003/006145

29

39. The method of claim 38, wherein the effective amount is between 10 and 3000 LD₅₀ units.
40. A method of treating a condition selected from the group consisting of facial wrinkles, rhytides and cosmetic alteration of lip and brow, in a subject in need thereof, comprising administering an effective amount of the composition of claim 1.
41. The method of claim 40, wherein the effective amount is between 2.5 and 400 LD₅₀ units.
42. A method of treating human headache disorders in a subject in need thereof, comprising administering an effective amount of the composition of claim 1.
43. The method of claim 42, wherein the effective amount is between 5 and 1,000 LD₅₀ units.
44. A method of treating human migraine headache disorders in a subject in need thereof, comprising administering an effective amount of the composition of claim 1.
45. The method of claim 44, wherein the effective amount is between 5 and 1,000 LD₅₀ units.
46. A method of treating human inflammatory conditions in a subject in need thereof, comprising administering an effective amount of the composition of claim 1.
47. The method of claim 46, wherein the effective amount is between 5 and 4,000 LD₅₀ units.
48. A method of treating myopathic or neuropathic pain in a subject in need thereof, comprising administering an effective amount of the composition of claim 1.
49. The method of claim 48, wherein the effective amount is between 5 and 4,000 LD₅₀ units.
50. A method of treating back pain or arthritic pain in a subject in need thereof, comprising administering an effective amount of the composition of claim 1.

29

WO 2004/060384

PCT/IB2003/006145

30

51. The method of claim 50, wherein the effective amount is between 5 and 4,000 LD₅₀ units.
52. A method of treating gastrointestinal spasm and strictures in a subject in need thereof, comprising administering an effective amount of the composition of claim 1.
53. The method of claim 52, wherein the effective amount is between 5 and 4,000 LD₅₀ units.
54. A method of treating a hyperthyrosis syndrome in a subject in need thereof, comprising administering of the composition of claim 1.
55. The method of claim 54, wherein the effective amount is between 5 and 4,000 LD₅₀ units.
56. A method of producing the composition of claim 1, comprising mixing albumin to botulinum toxin in a weight to weight ratio which exceeds 100 µg albumin to 1 ng of botulinum toxin.
57. A method of producing the composition of claim 1, comprising freeze drying or flash drying a mixture of a botulinum toxin and albumin in a weight to weight ratio of 100 µg albumin to 1 ng of botulinum toxin.
58. A method of producing the composition of claim 1, comprising lyophilizing a mixture of a botulinum toxin and albumin in a weight to weight ratio of 100 µg to 1 ng of botulinum toxin.
59. A composition comprising botulinum toxin and a sequestration agent, wherein the sequestration agent is present in an amount between 550 and 900,500 µg sequestration agent per 100 LD₅₀ units botulinum toxin.
60. The composition of claim 59, wherein the albumin is formulated as a solid albumin particle.

30

31

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT CO-OPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
22 July 2004 (22.07.2004)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2004/060384 A3

(51) International Patent Classification: A61K 38/16

Declarations under Rule 4.17:

(21) International Application Number:

PCT/IB2003/006145

(22) International Filing Date:

22 December 2003 (22.12.2003)

(23) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

60435,901 20 December 2002 (20.12.2002) US

(71) Applicant: BOTULINUM TOXIN RESEARCH ASSO-
CIATES, INC. (US/US); 1261 Furnace Brook Parkway,
Quincy, MA 02269 (US).

(72) Inventor: BOBODIC, Gary, E.; 90 Kensington Road,
Canton, MA 02021 (US).

(74) Agent: STOLE, Einar, Milbank, Tweed, Hadley & Mc-
cloy LLP, International Square Building, 1525 Eye Street,
N.W., Suite 1100, Washington, DC 20005 (US).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT,
RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE,
SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— as to applicant's entitlement to apply for and be granted
a patent (Rule 4.17(ii)) for the following designations AE,
AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG,
MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT,
RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT,
TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO patent
(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO,
SE, SI, SK, TR), OAPI patents (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

— as to the applicant's entitlement to claim the priority of the
earlier application (Rule 4.17(iii)) for the following designa-
tions AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY,
BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC,
EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN,
IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,
MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM,
PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW, ARIPO patents (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD,
SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY,
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI patents (BF, BJ,
CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG)

Published:

— with international search report
— before the expiration of the time limits for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments

(88) Date of publication of the international search report:
7 October 2004

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: PHARMACEUTICAL BOTULINUM TOXIN COMPOSITIONS

(57) Abstract: Botulinum toxin, a well known systemic poison, produces favorable therapeutic effect by virtue of regionally attaching to nerves within the neuromuscular junction and possibly other tissues in a target region of a particular tissue. This present invention provides compositions of botulinum toxin and a sequestration agent that increase sequestration and delivery of the botulinum toxin to neural and associated tissues, as compared with available formulations of botulinum toxins, and thereby produce a beneficial clinical effect. The sequestration agents of the present invention include proteins, lipids and carbohydrates. A preferred composition of the present invention comprises a botulinum toxin and an albumin. The present invention also provides methods of treating neuromuscular diseases and pain using the disclosed compositions and methods of making the disclosed compositions.

WO 2004/060384 A3

31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Application No.
 PCY/IB 03/06145

 A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 7 A61K38/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

 Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Classification of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/58472 A (HUNT TERRENCE J ; ALLERGAN SALES INC (US)) 16 August 2001 (2001-08-16) page 22, lines 11-18 page 32, lines 11-33	1-19
X	WO 97/35604 A (WISCONSIN ALUMNI RES FOUND) 2 October 1997 (1997-10-02) page 4, lines 13-23	1
X	WO 94/00481 A (ASS SYNAPSE BIOLOG) 6 January 1994 (1994-01-06) page 5, paragraphs 1,2 page 11, lines 19-26	1

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *B* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 July 2004

Date of mailing of the international search report

23/07/2004

Name and mailing address of the ISA

 European Patent Office, P.O. Box 2911, D-69111 Heidelberg 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-3340, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3010

Authorized officer

Engl, B

32

32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/IB 03/06145

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0158472	A	16-08-2001	AU 3331501 A	20-08-2001
			BR 0108173 A	21-01-2003
			CA 2400318 A1	16-08-2001
			CN 1398188 T	19-02-2003
			EP 1253932 A2	06-11-2002
			EP 1398038 A1	17-03-2004
			JP 2003522154 T	22-07-2003
			NZ 520201 A	30-04-2004
			WO 0158472 A2	16-08-2001
			US 2002064536 A1	30-05-2002
			US 2003118598 A1	26-06-2003
			US 2003138437 A1	24-07-2003
			US 2003138460 A1	24-07-2003
WO 9735604	A	02-10-1997	US 5756468 A	26-05-1998
			AT 210453 T	15-12-2001
			AU 7159496 A	17-10-1997
			CA 2250251 A1	02-10-1997
			DE 69618018 D1	24-01-2002
			DE 69618018 T2	16-05-2002
			EP 0889730 A1	13-01-1999
			JP 11507072 T	22-06-1999
			JP 3364658 B2	08-01-2003
			WO 9735604 A1	02-10-1997
WO 9400481	A	06-01-1994	AU 1629297 A	15-05-1997
			AU 4646393 A	24-01-1994
			CA 2138020 A1	06-01-1994
			EP 0654040 A1	24-05-1995
			JP 8506083 T	02-07-1996
			JP 3510886 B2	29-03-2004
			WO 9400481 A1	06-01-1994

34

**(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA BAJO EL TRATADO DE
COOPERACION DE PATENTES (PCT)**

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional

(43) Fecha de Publicación Internacional
22 Julio 2004 (22.07.2004)

PCT

(10) No. de Publicación Internacional
WO 2004/060384 A2

(51) Clasificación Internacional de Patente⁷:
A61K38/00

(21) Número de Solicitud Internacional:

PCT/IB2003/006145

(22) Fecha de Radicación Internacional:
22 Diciembre 2003 (22.12.2003)

(25) Idioma de Radicación: Inglés

(26) Idioma de Publicación: Inglés

(30) Datos de Prioridad:
60/435,901 20 Diciembre 2002 (20.12.2002)
US

(71) Solicitante: Botulinum Toxin Research
Associates, INC. [US/US]; 1261 Furnace Brook
Parkway, Quincy, MA 02169 (US).

(72) Inventor: BORODIC, Gary, E.; 90 Kennington
Road, Canton, MA 02021 (US).

(74) Agente: STOLE, Einar; Milbank, Tweed, Hadley &
McCloy LLP, International Square Building, 1825
Eye Street, N.W., Suite 1100, Washington, DC
20005 (US).

(81) Estados Designados (nacional): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE,
EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LB, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, AM, ZW.

(84) Estados Designados (regional):
Patente ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Patente
Euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), Patente Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ,
DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR) Patente OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG)

Declaraciones bajo la regla 4.17:

como autoriza el solicitante para aplicar y ser
concedida una patente (Regla 4.17 (ii)) para las
siguientes designaciones AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG,
ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN,
IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, ML, MW, MX, MZ, NI,
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, Patente
ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL,
SZ, TC, UG, ZM, ZW). Patente Euroasiática (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) Patente
Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, ML, PT,
RO, SE, SI, SK, TR) Patente OAPI (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,
TD, TG).

Como autoriza el solicitante para reivindicar la
prioridad de la solicitud más reciente (Regla 4.17
(iii)) para las siguientes designaciones: AE, AG,
AL, AM, AT, AU, AZ, DA, DB, BG, BR, BY, BZ,
CA, CH, CM, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ,
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT,
RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA,
ZM, ZW. Patente ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS,
MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW) Patente
Euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), Patente Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ,
DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR) Patente OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:

- Sin informe de búsqueda internacional y se
republica sobre el recibo de este informe.

Para los códigos de 2 letras y otras abreviaturas,
refiérase a "Guías de Notas de Códigos y
Abreviaturas" que aparece al principio de cada
entrega regular de la gaceta PCT.

(54) Título: COMPOSICIONES FARMACEUTICAS MEJORADAS DE TOXINA BOTULINICA

(57) Resumen: La toxina botulínica, un veneno sistémico bien conocido, produce efectos terapéuticos favorables en virtud de que se une regionalmente a nervios en la unión mioneural y posiblemente a otros tejidos en una región blanco de un tejido particular. La presente invención proporciona composiciones de toxina botulínica y un agente secuestrante que aumenta el secuestro y entrega de la toxina botulínica a los tejidos neurales y asociados, cuando se compara con las formulaciones disponibles de toxinas botulínicas, y por lo tanto produce un efecto clínico benéfico. Los agentes secuestrantes de la presente invención incluyen proteínas, lípidos y carbohidratos. Una composición preferida de la presente invención comprende una toxina Botulínica y una albúmina. La presente invención también proporciona métodos de tratamiento de enfermedades neuromusculares y dolor usando las composiciones divulgadas y los métodos de hacer las composiciones divulgadas.

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA BAJO EL TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional

(43) Fecha de Publicación Internacional
22 Julio 2004 (22.07.2004)

(10) No. de Publicación Internacional
PCT WO 2004/060384 A3

(51) Clasificación Internacional de Patente⁷:
A61K38/16

Declaraciones bajo la regla 4.17:

(21) Número de Solicitud Internacional:

PCT/IB2003/006145

(22) Fecha de Radicación Internacional:
22 Diciembre 2003 (22.12.2003)

(25) Idioma de radicación: Inglés

(26) Idioma de Publicación: Inglés

(30) Datos de Prioridad:
60/435,901 20 Diciembre 2002 (20.12.2002) US

(71) Solicitante: BOTULINUM TOXIN RESEARCH ASSOCIATES, INC [US/US]; 1261 Furnace Brook Parkway, Quincy, MA 02169 (US).

(72) Inventor: BORODIC, Gary, E.; 90 Kennington Road, Canton, MA 02021 (US).

(74) Agente: STOLE, Einar; Milbank, Tweed, Hadley & McCloy LLP, International Square Building, 1825 Eye Street, N.W., Suite 1100, Washington, DC 20005 (US).

(81) Estados Designados (nacional): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LB, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, AM, ZW.

(84) Estados Designados (regional): Patente ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Patente Euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Patente Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR) Patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

como lo autoriza el solicitante para aplicar y ser concedida una patente (Regla 4.17 (ii)) para las siguientes designaciones AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, ML, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, Patente ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TC, UG, ZM, ZW). Patente Euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) Patente Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, ML, PT, RO, SE, SI, SK, TR) Patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Como lo autoriza el solicitante para reivindicar la prioridad de la solicitud más reciente (Regla 4.17 (iii)) para las siguientes designaciones: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, DA, DB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CM, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW. Patente ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW) Patente Euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Patente Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR) Patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:

- Con informe de búsqueda internacional.
- Antes del límite de tiempo de expiración para enmienda de las reivindicaciones y para ser republicado en el caso de recepción de las enmiendas

(88) Fecha de Publicación del informe de búsqueda internacional 7 de Octubre de 2004

Para los códigos de 2 letras y otras abreviaturas, refiérase a "Guías de Notas de Códigos y Abreviaturas" que aparece al principio de cada entrega regular de la gaceta PCT.

(54) Título: COMPOSICIONES FARMACEUTICAS DE TOXINA BOTULINICA

(57) Resumen: La Toxina Botulínica, como bien se conoce es un veneno sistémico, produce efectos terapéuticos favorables en virtud de que se une regionalmente a nervios en la unión mioneural y posiblemente a otros tejidos en una región blanco de un tejido particular. La presente invención proporciona composiciones de toxina Botulínica como un agente secuestrante que aumenta el secuestro y entrega de la toxina Botulínica a los tejidos neurales y asociados, cuando se compara con las formulaciones disponibles de toxinas botulínicas, y por lo tanto produce un efecto clínico benéfico. Los agentes secuestrantes de la presente invención incluyen proteínas, lípidos y carbohidratos. Una composición preferida de la presente invención comprende una toxina Botulínica y una albúmina. La presente invención también proporciona métodos de tratamiento de enfermedades neuromusculares y dolor usando las composiciones divulgadas y los métodos de hacer las composiciones divulgadas.

36

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud
Internacional No.
PCT/IB 03/06145

CLASIFICACIÓN DE LA MATERIA OBJETO
IPC 7 A61K38/16

De acuerdo con la clasificación de Patentes Internacional (IPC) o ambas clasificación nacional IPC

B. Campos investigados
Documentación Mínima Consultada (Sistema de clasificación seguida por la clasificación de símbolos)
IPC 7 A61K

Documentación consultada a parte de la documentación mínima a la extensión tales documentos se incluyen en los campos consultados.

Base electrónica de datos consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, donde se practicó, y los términos de búsqueda usados).
EPO - Interno, WPI, Datos, PAJ, BIOSIS

C. Documentos que se consideran relevantes.

Categoría *	Cita del documento, con indicación, donde sea apropiado, de los pasajes relevantes	Relevante para reivindicación No.
X	WO 01/58472 A (HUNT TERRENCE J ; ALLERGAN SALES INC (US)) 16 de Agosto 2001 (2001-08-16) Página 22, líneas 11-18 Página 32, líneas 11-33	1-19
X	WO 97/35604 A (WISCONSIN ALUMNI RES FOUND) 2 de Octubre 1997 (1997-10-02) Página 4, líneas 13-23	1
X	WO 94/00481 A (ASS SYNAPSE BIOLOG) 6 de Enero 1994 (1994-01-06) Página 5, párrafos 1, 2 Página 11, líneas 19-26	1

☐ Documentos posteriores que están listados en la continuación de la casilla C ☒ Miembros de la familia de patentes listados en el anexo.

* Categorías especiales de los documentos citados:

"A" Documento que define el estado general de arte que no se considera de relevancia particular. "E" Últimos documentos pero publicados en o después de la fecha de radicación internacional. "L" Documento que puede tener dudas sobre la prioridad de la(s) reivindicación(es) el cual se cita para establecer la fecha de publicación de otra cita o de otra razón especial. (especificada). "O" Documento que se refiere a una divulgación oral, uso exhibición u otro medio "P" Documento publicado anterior a la fecha de radicación internacional pero más tarde que la fecha prioritaria reivindicada.	"T" último documento publicado después de la fecha de radicación internacional o fecha prioritaria y que no está en conflicto con la solicitud pero se cita para entender el principio o teoría que resalta la invención. "X" Documento de relevancia particular; la invención reivindicada no se puede considerar novedosa o no se puede considerar que involucre un nivel inventivo cuando se toma el documento solo. "Y" Documento de relevancia particular; la invención reivindicada no se debe considerar que involucre un nivel inventivo cuando el documento está combinado con uno o más de otros de tales documentos, tal combinación pertenece obviamente a una persona versada en el arte. "&" Documento miembro de la misma familia de patentes
--	---

Fecha real en que se completa la búsqueda Internacional. 15 de Julio de 2004	Fecha de correo del Informe de búsqueda internacional 23/07/2004
Nombre y dirección de Correo de la ISA. European Patent Office, P B 5818 Patentleean 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3018	Funcionario Autorizado Engl. B

36

37

Solicitud
Internacional No.
PCT/IB 03/06145

○

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS MEJORADAS DE TOXINA BOTULÍNICA

Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional U.S. Serial No. 60/435, 901 que se radicó en Diciembre 20 de 2002.

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a composiciones farmacéuticas mejoradas que comprenden la neurotoxina botulínica y un agente secuestrante. La invención además proporciona composiciones farmacéuticas y métodos para el tratamiento de una variedad de enfermedades neuromusculares.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La neurotoxina botulínica, una toxina aislada de una cepa de *Clostridium botulinum*, una toxina mortal en concentraciones y cantidades altas, ha sido utilizada como un terapéutico valioso para el tratamiento de muchas enfermedades neuromusculares (e.g., distonía, espasmo hemifacial, bruxismo, espasticidad, parálisis cerebral, torticollis), así como también desordenes sensoriales y desordenes cutáneos (dolor miofacial, migraña, cefalea tensional, neuropatía, hiperhidrosis).

Antes de ésta invención, nunca se había identificado como importante para la efectividad clínica de los farmacéuticos a base de la toxina botulínica, la unión *in vivo* de la albúmina a la toxina botulínica. Mediante el mejoramiento del secuestro regional de la neurotoxina y facilitando la saturación de los receptores de la neurotoxina en los tejidos neuronales, las formulaciones con albúmina en alta concentración, mejoran la efectividad clínica de la toxina botulínica y reducen los efectos colaterales tales como aquellos que resultan por la difusión de la toxina

botulínica desde el sitio de administración. No se había sugerido antes, que alterando la formulación de la toxina botulínica mediante el incremento de su concentración relativa a la neurotoxina se podría mejorar la efectividad para el tratamiento de enfermedades humanas. Las preparaciones de toxina botulínica que existen disponibles corrientemente para la práctica clínica son BOTOX®, DYSPORT®, MYOBLOC®. La presente invención identifica el mecanismo y proporciona composiciones de utilidad mejorada de fármacos a base de toxina botulínica, mediante el incremento de la concentración de un agente secuestrante y otros agentes aglutinantes para mejorar el secuestro y mejorar la efectividad donde han fallado otras preparaciones disponibles de la toxina botulínica.

En años recientes, Borodic *et al.*, han caracterizado el efecto regional de la toxina botulínica utilizando fibras musculares morfométricas, coloración con colinesterasa, y arrugamiento cutáneo de las depresiones del tono del músculo facial. (Borodic (1992) Botulinum A toxin for (expressionistic) ptosis overcorrection alter frontales sling. *Ophthalmic Plastic and Reconstructive Surg.* 8 (2): 137-142; incorporada aquí en su totalidad por referencia).

Desde su introducción como un agente terapéutico, la medida farmacéutica de la denervación o actividad biológica de la toxina botulínica ha sido la unidad LD₅₀ utilizando un ratón Swiss Webster de 18-22 gramos, cuantificada estadísticamente por inyección en cohortes de ratones en diferentes diluciones de la proteína neurotoxina botulínica purificada y sus complejos de proteína. Esta medida tiene la ventaja de simplicidad, de una determinación clara del punto final (ratón vivo o muerto), sin embargo la unidad LD₅₀ no predice el comportamiento clínico de varias formulaciones de toxina botulínica cuando se compara en estudios clínicos. Por ejemplo, una preparación de toxina botulínica Tipo B (MYOBLOC®) requiere de 5,000 – 15,000 unidades LD₅₀ para tratar la tortícolis, mientras que otra preparación de toxina botulínica Tipo A (BOTOX®) requiere

solamente de 100-300 unidades LD₅₀. Similarmente la unidad LD₅₀ ha fallado para distinguir las diferencias en el comportamiento terapéutico de distintas fuentes del mismo inmutotipo de toxina botulínica. Por ejemplo, se requieren aproximadamente de 50 – 300 unidades de BOTOX® para tratar el blefaroespasma y la distonía cervical comparado con 200 – 1200 unidades de DYSPORT®, otra preparación de toxina botulínica Tipo A. La Tabla 1 ilustra la variación de las dosis para diferentes enfermedades.

Tabla 1: Comparación de la dosis entre varias formulaciones farmacéuticas de toxina botulínica.

Formulación	Blefaroespasma Esencial	Tortícolis
BOTOX®	50 U ¹	200 U
DYSPORT®	200 U	600 – 1,200 U
MYOBLOC®	3,000 – 5,000 U	10,000 – 15,000 U

¹ Unidades (U): son unidades LD₅₀ determinadas utilizando ratones Swiss Webster de 20-30 gramos, como aquí se describe.

A. Complicaciones Asociadas con las Formulaciones Convencionales de Toxina botulínica.

Más allá de los requerimientos de dosis efectiva, se han señalado diferencias sustanciales en la tasa de complicación en las cantidades terapéuticas de diferentes preparaciones botulínicas. Los efectos colaterales tales como aquellos que resultan de la difusión de la toxina botulínica desde el sitio de administración parecen ser dependientes de la formulación de la toxina botulínica. Por ejemplo, las tasas de disfagia (dificultada al tragar) son una complicación bien conocida en la administración de toxina botulínica cuando se utiliza para el tratamiento de distonía cervical. (Borodic *et al.*, (1990) Botulinum A Toxin for the treatment of spasmodic torticollis. *Dysphagia and regional Toxin Spread. Head & Neck*, 12: 392-398; incorporada aquí en su totalidad por referencia). Las diferencias en la tasa de ésta complicación entre las formulaciones se han

apreciado bien al revisar la literatura entre 1984-1995. Además se han reportado diferencias en la tasa de ptosis cuando se comparan varios inmunotipos y diferentes preparaciones del mismo inmunotipo (ver Tabla 1). Ha llegado a ser bien aceptado que ésta complicación es el resultado de la difusión de la toxina botulínica afuera de los sitios de inyección, una propiedad que está en conflicto con el objetivo clínico de contener la denervación o efecto biológico a una región blanco específica.

Tabla 2: Complicaciones relacionadas con la difusión entre varias formulaciones farmacéuticas de la toxina botulínica

Complicación	BOTOX [®]	DYSPO [®]	MYOBLOC [®]
Ptosis ¹	< 2%	12-15%	30-40%
Disfagia	< 2%	14-21%	10-17%

¹ Nussgen et al., (1997) Comparison of two botulinum-toxin preparations in the treatment of essential blepharospasm. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol* 235(4): 197-199

² Phase 3 Studies 1998-1989 for oculinum Meta-analysis of clinical studies on Dysphagia and Bothulinum 1995 at NIH (Borodic).

³ Lew et al., (1997) Botulinum toxin type B: a double-blind, placebo-controlled, safety and efficacy study in cervical dystonia. *Neurology* 49(3): 701-707.

En 1991, Borodic et al., demostraron un modelo histológico que demuestra un gradiente de difusión histoquímica y morfológica a partir del punto de las inyecciones de toxina botulínica. (Borodic et al., (1991) Botulinum toxin. Clinical and scientific aspects. *Ophthalmology Clinics of North America* 4: 491-503; incorporado aquí en su totalidad por referencia). Además se demostró que el gradiente depende la dosis sobre bandas únicas de músculo y es capaz de cruzar los planos faciales. Además se demostró el modelo de difusión en un patrón de arrugas faciales de la frente humana. (Borodic et al., (1992) Botulinum toxin for torticollis spasmodic, multiple vs. Single point injections per muscle. *Head and Neck* 14: 33-37). Posteriormente la difusión se utilizó para explicar el mecanismo de la disfagia después de las inyecciones superficiales de la inyección botulínica para el cuello humano y la ptosis (complicación de párpado caído) después de las

inyecciones peri-oculares para el tratamiento del blefaroespasma esencial. La ptosis resulta de la difusión de la actividad de bloqueo neuro-muscular desde el borde del párpado a la porción muscular del retractor del párpado superior, el cual descansa en el espacio orbital superior. La disfagia resulta de la difusión del efecto de debilitamiento neuro-muscular desde el músculo esternomastoideo, blanco en el tratamiento de tortícolis, hasta la musculatura peri-faríngea la cual genera la fuerza para el tragado efectivo. A partir de ambos modelos histológicos y la experiencia clínica, la difusión parece estar directamente relacionada con la cantidad de toxina dada en las unidades LD₅₀, es decir, a mayores unidades de dosis LD₅₀ utilizadas, mayor difusión desde el punto de inyección. Según el resumen de la literatura de los años 1980 y 1990, la disfagia es más común con el uso de DYSPORT® que con el uso de BOTOX® en dosis efectivas. Recientemente, a partir de estudios hechos por centros europeos, han sido confirmadas las diferencias en las tasas de disfagia (Ranoux *et al.*, (2002) Respective Potencies of DYSPORT® and BOTOX®: a double blind, randomized, crossover study in cervical dystonia. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 72: 459 – 462). También se han observado diferencias en las tasas de ptosis en el tratamiento del blefaroespasma comparando BOTOX® con DYSPORT® con BOTOX® que demuestran menos incidencia común de ésta complicación (Nussgens *et al.*, (1997) Comparison of two botulinum-toxin preparations in the treatment of essential Blepharospasm. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 235(4): 197-199). Las principales diferencias en la complicación ptosis han sido reportadas cuando se utiliza toxina botulínica Tipo B para el tratamiento de las arrugas del entrecejo y la frente, comparada con la botulínica Tipo A (BOTOX®). (Holck *et al.*, Comparison of High Dose Botulinum Toxin Type B to Botulinum Type A in the Treatment of Lateral Canthal Rhytides American Society of Ophthalmic Plastic and Reconstructive Surgeons Annual Meeting, Anaheim, CA 11-14-03).

B. Secuestro.

La albúmina se utilizó inicialmente para formular farmacéuticos a base de toxina botulínica a causa de su efecto estabilizante sobre la actividad biológica de la neurotoxina en diluciones altas (ver, Schantz, Botulinum Toxin Therapy, Marcel Dekker 1994). La dilución de los cristales de la toxina botulínica purificada con solución salina fisiológica o agua causaría la pérdida de la actividad biológica y las propiedades farmacológicas en diluciones altas. Adicionalmente, se ha reportado que la albúmina ayuda a mantener la molécula de neurotoxina unida a los contenedores de vidrio. Durante el desarrollo pre-clínico del BOTOX® o cualquier otra toxina botulínica preparada para uso farmacéutico, no se apreció ninguna otra importancia de la albúmina diferente de ser un estabilizador de la dilución y un excipiente para mantener la neurotoxina unida al vidrio.

El BOTOX® y el DYSPORT® son derivados de diferentes cepas de especies Clostrídicas. El BOTOX® se deriva de la cepa Hall de *Clostridium botulinum* mantenida originalmente por la universidad de Wisconsin, mientras que el DYSPORT® se deriva de la Colección de Microbiología británica. Existe reactividad inmunológica cruzada entre los productos puesto que ambos productos se derivan de las cepas del inmunotipo A. A pesar de los inmunotipos similares, las respuestas clínicas entre el BOTOX® y el DYSPORT® se pueden explicar mediante las diferencias en los excipientes utilizados en cada formulación. La diferencia en las concentraciones de albúmina sérica humana entre el BOTOX® y el DYSPORT® se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Contenido de albúmina sérica humana de varias formulaciones farmacéuticas de toxina botulínica.

Formulación	Albúmina ¹	LD ₅₀ /μg de albúmina
BOTOX®	500 μg	0.2
DYSPORT®	125 μg	5.0

¹La albúmina se representa en mg por 100 unidades LD₅₀ de toxina botulínica. Existen otras diferencias que incluyen la presencia de azúcares estabilizantes, la lactosa se usa en el DYSPORT® y no se usa en el BOTOX®.

En múltiples estudios clínicos, la discrepancia en la albúmina entre el BOTOX® y el DYSPORT® es casi idéntica a la diferencia en los requerimientos de dosis observados entre el BOTOX® y el DYSPORT®. La correlación entre la relación de albúmina/potencia clínica se refuerza además por cambios en las propiedades farmacológicas del DYSPORT® cuando la albúmina se adiciona a los viales utilizando un modelo animal de hemi-diafragma de ratón. Wohlfahrt *et al.* Notaron que utilizando este modelo que adiciona la albúmina a uno de los viales de DYSPORT® se alcanzaba una actividad biológica más alta que utilizando el modelo de hemi-diafragma de ratón. (Biglalke *et al.*, (2001) Botulinum A toxin: DYSPORT® improvement of biological availability. *Exp. Neurol.* 168(1): 162-170). Los autores sugieren que el incremento en la actividad biológica resulta del incremento en la estabilidad, según se midió con el bio-ensayo LD₅₀ en ratón producido por el incremento en la concentración de albúmina. (Biglalke *et al.*, (2001) Botulinum A toxin: DYSPORT® improvement of biological availability. *Exp. Neurol.* 168(1): 162-170). Los autores explicaron las diferencias de la albúmina en el bio-ensayo LD₅₀ sin referencia al mecanismo de acción en los tejidos o la importancia farmacológica-farmacocinética, es decir, la unión de la albúmina *in vivo*, el secuestro mejorado y el mejoramiento en los efectos terapéuticos. Además, los mismos autores observaron en una preparación de diafragma de rata, que la adición de albúmina a la preparación de BOTOX® no podría incrementar sustancialmente los efectos de denervación regional y no apoyaría ningún cambio en la formulación. Los hallazgos de estos investigadores concluyeron que hubo un efecto de la concentración de albúmina sobre las medidas LD₅₀, sin embargo ese trabajo no demuestra ningún incremento en la potencia del BOTOX® en la denervación regional o que el DYSPORT® pudiera ser mejorado para dar cualquier potencia de denervación mayor sobre el BOTOX®. Ese trabajo se limitó por la naturaleza *in vitro* de sus experimentos, es decir, que utilizó una disección de

animal no perfundido con sangre de un nervio motor (nervio frénico) y músculo de diafragma, el cual falla al tener en cuenta las diluciones y el flujo del fluido tisular capaz de lavar la toxina inyectada desde el tejido blanco antes de la unión con los receptores terminales del axón del nervio. El tiempo real de aplicación requiere en un análisis *in vivo* de los efectos de la albúmina sobre la denervación regional como se resume en los siguientes experimentos. Ese trabajo identificó razones para las diferencias en las LD₅₀ medidas por el ensayo de letalidad en ratones. La conclusión fue que no mejoró la potencia o efectividad que podría hacerse sobre la preparación de BOTOX® existente y es directamente contraria a la conclusión aquí derivada. (Hanover Germany International Botulinum Toxin Meeting 2002).

Las diferencias en potencia, emisiones que se relacionan con la difusión y la contención del efecto biológico, son importantes en la farmacología de los farmacéuticos a base de botulinum. Aquí se describe un método para alterar las composiciones de farmacéuticos a base de botulinum para mejorar la potencia, incrementar el secuestro de la toxina botulínica y limitar los efectos adversos de los farmacéuticos a base de botulinum.

RESUMEN DE LA INVENCION.

La presente invención proporciona una composición que comprende toxina botulínica y un agente secuestrante para uso en el tratamiento de varias enfermedades neuromusculares y denervación localizada. En una incorporación, el agente secuestrante está presente en una cantidad entre 550 y 550,000 μg de agente secuestrante por 100 unidades LD₅₀ de toxina botulínica. En otra incorporación, el agente secuestrante esta presente en una cantidad entre 550 y 5,500 μg de agente secuestrante por 100 unidades LD₅₀ de toxina botulínica. Además en otra incorporación el agente secuestrante está presente en una cantidad entre 5,500 y 13,000 μg de agente secuestrante por 100 unidades LD₅₀ de toxina botulínica. En una incorporación preferida, el agente secuestrante está

 45

46

presente en una cantidad entre 13,000 y 50,500 μg de agente secuestrante por 100 unidades LD_{50} de toxina botulínica. En una incorporación más preferida, el agente secuestrante está presente en una cantidad entre 50,500 y 505,000 μg de agente secuestrante por 100 unidades LD_{50} de toxina botulínica. En la incorporación más preferida el agente secuestrante está formulado como microesferas encapsuladas en una cantidad entre 50,500 y 90,500 μg de agente secuestrante por 100 unidades LD_{50} de toxina botulínica.

En otra incorporación, la presente invención proporciona una composición que comprende toxina botulínica y un agente secuestrante en donde el agente secuestrante está presente en una cantidad entre 550 y 90,500 μg de agente secuestrante por 100 unidades LD_{50} de toxina botulínica, en donde la albúmina se puede formular como partículas de albúmina sólida.

La toxina botulínica de las composiciones presentes se pueden seleccionar de una variedad de cepas de *Clostridium botulinum*. En una incorporación preferida, la composición de la presente invención comprende una toxina botulínica seleccionada del grupo que consiste de toxina botulínica tipos A, B, C, D, E, F, y G. En una incorporación preferida, la toxina botulínica es toxina botulínica tipo A. En una incorporación más preferida, la toxina botulínica es toxina botulínica tipo A de la cepa Hall de *Clostridium botulinum*.

En otra incorporación, las composiciones de la presente invención comprenden una toxina botulínica que consiste esencialmente de toxina botulínica de cadena liviana fraccionada. En aún otra incorporación, la toxina botulínica consiste esencialmente de una mezcla de híbridos y formas de cadena traslocada de toxina botulínica. En además otra incorporación, la toxina botulínica consiste esencialmente de formas quiméricas de toxina botulínica. Sin embargo la presente invención puede utilizar cualquier toxina botulínica, fragmento de toxina botulínica que retenga actividad neuro-tóxica, híbridos y quimeras de toxina botulínica, toxina

46

botulínica modificada químicamente, y actividades específicas bien conocidas por aquellos versados ordinariamente en el arte, en una incorporación la toxina botulínica se purifica para una actividad específica mayor que o igual a cerca de 20 unidades LD₅₀ por nanogramo de toxina botulínica.

La presente invención proporciona composiciones de toxina botulínica y un agente secuestrante donde la relación de unidades LD₅₀ de toxina botulínica a μ g de agente secuestrante es menor que o igual a cerca de 0.2 para toxina botulínica tipo A y es menor que o igual a cerca de 10 para toxina botulínica tipo B.

Cada composición de la presente invención, en adición para comprender una toxina botulínica y un agente secuestrante, además puede comprender un vehículo aceptable farmacéuticamente y/o zinc y/o una sal de zinc. En una incorporación, la toxina botulínica no está unida covalentemente al agente secuestrante. En otra incorporación, la toxina botulínica esta unida covalentemente al agente secuestrante.

La presente invención proporciona composiciones de una toxina botulínica y un agente secuestrante, en donde el agente secuestrante se selecciona del grupo que consiste de: proteínas, lípidos, y carbohidratos. En una incorporación preferida, el agente secuestrante es albúmina, colágeno, epinefrina o hialuronato. En una incorporación más preferida, el agente secuestrante es hialuronato. En la incorporación más preferida el agente secuestrante es albúmina.

La presente invención además proporciona composiciones que comprenden una toxina botulínica y un agente secuestrante, en donde el agente secuestrante es una albúmina, preferiblemente albúmina sérica humana. Además, en una incorporación, la albúmina de las presentes composiciones se produce recombinantemente. En una incorporación, la albúmina esta presente en una cantidad entre 550 y 5,500 μ g de albúmina por 100 unidades LD₅₀ de toxina

 48

48

botulínica. En otra incorporación, la albúmina esta presente en una cantidad entre 5,500 y 13,000 μg de albúmina por 100 unidades LD_{50} de toxina botulínica. En una incorporación preferida la albúmina está presente en una cantidad entre 13,000 y 50,500 μg de albúmina por 100 unidades LD_{50} de toxina botulínica. En una incorporación más preferida, la albúmina está presente en una cantidad entre 50,500 y 505,000 μg de albúmina por 100 unidades LD_{50} de toxina botulínica. En una incorporación más preferida la albúmina esta formulada como micro-esferas encapsuladas en una cantidad entre 50,500 y 90,500 μg de albúmina por 100 unidades LD_{50} de toxina botulínica.

En una incorporación de la presente invención, las composiciones comprenden una toxina botulínica y al menos un agente secuestrante. En una incorporación preferida, las composiciones de la presente invención comprenden una toxina botulínica y albúmina y además comprenden uno o más agentes secuestrantes adicionales.

La presente invención también proporciona métodos para producir denervación localizada en un individuo con necesidad de ésta, que comprende la administración de una cantidad efectiva de cualquiera de las composiciones de la presente invención que están descritas aquí. En una incorporación, los métodos de la presente invención se usan para producir denervación en un individuo que sufre de una enfermedad neuromuscular asociada con el aumento del tono muscular y con movimiento involuntario. En otra incorporación, los métodos de la presente invención se usan para producir denervación en un individuo que sufre de enfermedad neuromuscular. Preferiblemente, la enfermedad neuromuscular esta caracterizada por aumento del tono muscular y/o movimiento involuntario, que incluye pero no se limita a. distonías, daño o enfermedad en la médula espinal, esclerosis múltiple, espasticidad, parálisis cerebral, ataque fulminante y similares. Preferiblemente, la enfermedad neuromuscular asociada con aumento del tono muscular y/o movimiento involuntario es el blefaroespasma o tortícolis.

48

Más preferiblemente, la enfermedad neuromuscular asociada con aumento del tono muscular y con movimiento involuntario es blefaroespasma.

En una incorporación, la presente invención proporciona métodos para producir denervación en un individuo que sufre de blefaroespasma que comprenden la administración entre 10-200 unidades LD₅₀ de una composición de la presente invención como aquí se describe. En otra incorporación, la presente invención proporciona métodos para producir denervación en un individuo que sufre de tortícolis. Preferiblemente, la cantidad efectiva de una composición de la presente invención está entre 10 y 3,000 unidades LD₅₀.

En otra incorporación, la presente invención proporciona un método para tratar una condición seleccionada de un grupo que consiste de arrugas faciales, rhytides, y alteración cosmética de labio y ceja, en un individuo con necesidad de éste, que comprende la administración de una cantidad efectiva de una composición de la presente invención, como aquí se divulga. Preferiblemente, la cantidad efectiva está entre 2.5 y 400 unidades LD₅₀.

En aún otra incorporación, la presente invención proporciona un método para tratar los desórdenes de dolor de cabeza humanos en individuos con necesidad de éste, que comprende la administración de una cantidad efectiva de una composición de la presente invención, como aquí se divulga. Preferiblemente, la cantidad efectiva está entre 5 y 1,000 unidades LD₅₀.

En otra incorporación, la presente invención proporciona un método para el tratamiento de los desórdenes de dolor de cabeza por migraña en humanos en un individuo con necesidad de él, que comprende la administración de una cantidad efectiva de una composición de la presente invención, como aquí se divulga. Preferiblemente, la cantidad efectiva está entre 5 y 1,000 unidades LD₅₀.

50

La presente invención también proporciona un método para el tratamiento de las condiciones inflamatorias en humanos en un individuo con necesidad de él, que comprende la administración de una cantidad efectiva de una composición de la presente invención, como aquí se divulga. Preferiblemente, la cantidad efectiva está entre 5 y 4,000 unidades LD₅₀.

La presente invención también proporciona un método para el tratamiento del dolor miopático o neuropático en un individuo con necesidad de él, que comprende la administración de una cantidad efectiva de una composición de la presente invención, como aquí se divulga. Preferiblemente, la cantidad efectiva está entre 5 y 4,000 unidades LD₅₀.

La presente invención también proporciona un método para el tratamiento del dolor de espalda o dolor artrítico en un individuo con necesidad de él, que comprende la administración de una cantidad efectiva de una composición de la presente invención, como aquí se divulga. Preferiblemente, la cantidad efectiva está entre 5 y 4,000 unidades LD₅₀.

En aún otra incorporación la presente invención también proporciona un método para el tratamiento del espasmo gastrointestinal y constricciones en un individuo con necesidad de él, que comprende la administración de una cantidad efectiva de una composición de la presente invención, como aquí se divulga. Preferiblemente, la cantidad efectiva está entre 5 y 4,000 unidades LD₅₀.

La presente invención también proporciona un método para el tratamiento de un síndrome de hiperhidrosis en un individuo con necesidad de él, que comprende la administración de una cantidad efectiva de una composición de la presente invención, como aquí se divulga. Preferiblemente, la cantidad efectiva está entre 5 y 4,000 unidades LD₅₀.

50

La presente invención también proporciona un método para producir las composiciones aquí descritas. En una incorporación, el método comprende mezclar un agente secuestrante con toxina botulínica. En otra incorporación el método comprende secar por congelación o secar flash un agente secuestrante con toxina botulínica. Preferiblemente, la toxina botulínica y el agente secuestrante están en una relación peso a peso que excede de 100 μ g de agente secuestrante por 1 mg de toxina botulínica.

La presente invención también proporciona un uso de cualquiera de las composiciones aquí divulgadas para el tratamiento de una enfermedad neuromuscular, dolor, condiciones inflamatorias arrugas faciales, rhytides, alteración cosmética de labio y ceja y similares. La presente invención también proporciona un uso de cualquiera de las composiciones aquí divulgadas para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad neuromuscular, dolor, condiciones inflamatorias, arrugas faciales, rhytides, alteración cosmética de labio y ceja y similares.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención describe un método y una composición para mejorar la efectividad clínica de la preparación de la toxina botulínica para uso clínico mediante el incremento del secuestro de moléculas de neurotoxina botulínica en la región blanco del cuerpo de humanos o mamíferos para terapia por el uso de un agente secuestrante o "ancla molecular". El mejoramiento del secuestro utilizando una concentración de macromoléculas tales como proteínas (e.g., albúmina, colágeno y similares) y/o lípidos y/o polisacáridos (e.g., hialuronato y similares) pueden ser útiles para proporcionar un ancla molecular a las moléculas de neurotoxina que previenen la difusión afuera del punto de inyección, causando máxima saturación de los receptores de neurotoxina botulínica, por lo tanto logrando mayor eficacia con la cantidad de neurotoxina usada para alcanzar los

52

efectos clínicos deseados. El agente secuestrante mejora la contención de la denervación regional, y mejora los resultados clínicos. El secuestro incrementado permite una mejor entrega al terminal del nervio con captación mejorada y aumento de los efectos denervantes y otros efectos biológicos. La invención requiere la adición de una agente secuestrante a la formulación de neurotoxina el cual enlaza a la neurotoxina, previene la diseminación de la neurotoxina y demuestra una mejora en la respuesta clínica en pacientes que han sido previamente tratados sin la molécula vehículo en las concentraciones preferidas. El agente secuestrante puede ser un excipiente existente en concentraciones significativamente más altas que las usadas previamente (tales como albúmina sérica humana), o un material que no ha sido utilizado previamente para estabilizar la toxina botulínica (tal como hialuronato de sodio). El agente secuestrante se debe unir a la molécula de toxina botulínica y prevenir su difusión, de tal manera que la neurotoxina pueda reaccionar con el extremo terminal del nervio o con cualquier estructura neural de tal forma que se mejora la efectividad de la terapia.

A. Definiciones

Como aquí se usa "Toxina botulínica" significa una toxina proteínica y sus complejos aislados de cepas de *Clostridium botulinum*, incluyendo varios inmunotipos tales como A, B, C1, C2, C3, D, E, F y G.

Como aquí se usa "una cantidad efectiva" es una cantidad suficiente para producir una respuesta terapéutica. Una cantidad efectiva se puede determinar con estudios de escalamiento de dosis en ensayos clínicos marcados abiertos o en estudios bin con ensayos ciegos.

Como aquí se usa "enfermedades neuromusculares" se refiere a cualquier enfermedad que afecte adversamente tanto a los elementos nerviosos (cerebro,

52

médula espinal, nervio periférico) como a los elementos musculares (músculo liso o estriado), que incluyen pero no se limitan a desórdenes del movimiento involuntario, distonías, daño o enfermedad en la médula espinal, esclerosis múltiple, espasticidad, parálisis cerebral, y ataque fulminante.

Como aquí se usa, el término "enfermedades neuromusculares" se refiere a cualquier enfermedad que afecte adversamente tanto a los elementos nerviosos (cerebro, médula espinal, nervio periférico) como a los elementos musculares (músculo liso o estriado), que incluyen pero no se limitan a desórdenes del movimiento involuntario, distonías, daño o enfermedad en la médula espinal, esclerosis múltiple, espasticidad, parálisis cerebral, y ataque fulminante.

Como aquí se usa, el término "vehículo aceptable farmacéuticamente" significa una composición química, compuesto, o solvente con el cual se puede combinar un ingrediente activo y con el cual, después de la combinación se puede usar para administrar el ingrediente activo a un individuo. Como aquí se usa, "vehículo aceptable farmacéuticamente" incluye, pero no está limitado a, uno o más de los siguientes: excipientes; agentes activos de superficie; agentes dispersantes; diluyentes inertes; agentes de granulación y desintegración; agentes de unión; agentes lubricantes; preservativos; composiciones degradables fisiológicamente tal como gelatina; vehículos acuosos y solventes; vehículos oleosos y solventes; agentes de suspensión; agentes humectantes o de dispersión, agentes emulsificantes; agentes emolientes; amortiguadores, sales; agentes adelgazantes; rellenos; antioxidantes; agentes estabilizantes; materiales hidrofóbicos o poliméricos aceptables farmacéuticamente y otros ingredientes conocidos en el arte y descritos, por ejemplo en, Genaro, ed., 1985, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., la cual se incorpora aquí por referencia.

Como aquí se usa "agente secuestrante" significa un agente que mejora la localización y/o retención de la toxina botulínica en el sitio de administración.

Como aquí se usa "individuo" significa un mamífero

B. ALBUMINA

La albúmina sérica humana endógena se enlaza a moléculas circulantes nativas, tales como ácidos grasos libres, bilirrubina, hormonas y zinc. Adicionalmente, la albúmina humana circulante puede unirse con muchos agentes farmacéuticos que pueden influir en la potencia, tasa de complicación, aclaramiento, y otras propiedades farmacodinámicas de estos agentes. Ejemplos incluyen salicilatos, sulfisoxazoles, warfarina, fenilbutazona, digtoxina, fenitoina, oxacilina, bencilpenicilina, lasix, indometacina, diazepam y quinidina entre otros. También se conocen que los péptidos y las proteínas se unen a albúmina sérica humana, Las hormonas peptídicas tales como gastrina, corticotropina, melatonina también se conocen que se unen a albúmina sérica humana.

Algunos sitios de unión han sido identificados y la unión se piensa que sea no-covalente. Adicionalmente, la albúmina se puede unir no-covalentemente a cationes que sirven como cofactores para la reactividad enzimática de porciones del complejo polipéptido de la toxina botulínica. Específicamente, el zinc es un cofactor para la actividad de la endopeptidasa de la cadena ligera de la toxina botulínica la cual entra a las células blanco después de que la cadena pesada se une a los receptores de proteína de la superficie de la célula. Altas cantidades de zinc enlazadas a la albúmina mejoran la actividad de la endopeptidasa. El zinc que se une a la albúmina depende de la dosis. La saturación de zinc que se une a la albúmina mejora el efecto de denervación de la toxina botulínica..

55

A causa de la gran masa atómica de la albúmina y de otras propiedades proteínicas, se aclara fisiológicamente desde el área de la inyección por absorción en los vasos linfáticos, no por absorción en los vasos sanguíneos, un proceso que es mucho más lento que la remoción de especies moleculares más pequeñas. La relevancia a los farmacéuticos de la toxina botulínica se refiere al papel tanto de mantener la actividad biológica por promover el contacto del nervio como por prevenir la salida de neurotoxina libre liberada en los puntos de inyección. DYSPOORT®, con su baja concentración de albúmina, ofrece menos secuestro para el complejo de neurotoxina y por consiguiente, después de la inyección se produce la difusión fuera del área anatómica blanco. El efecto clínico es una mayor difusión regional de la quimiodenervación, lo cual resulta en un aumento de las complicaciones (ptosis, disfagia, ver la Tabla 2). Con el objeto de compensar este comportamiento biológico, los clínicos en la práctica o en estudios tienen que dar cuatro a cinco veces neurotoxina para alcanzar el mismo grado de actividad biológica que con una alta concentración de albúmina. Con menos inmunotipos potentes tales como toxina botulínica tipo B (MYOBLOC®), se necesitan grandes dosis para lograr el mismo bio-efecto regional, por lo tanto o una difusión posterior ocurre con aumento de las tasas de complicación (ver tabla 2). Administrando más toxina botulínica (una carga de proteína más alta) resultan tasas más altas de inmunidad después de inyecciones repetidas. (Borodic *et al* (1996) Botulinum Toxin, Immunology and problems with Available Materials, *Neurology* 46: 26-29).

El MYOBLOC® se formula a un pH ácido pH<6.0, el cual proporciona un aumento de la estabilidad y la estabilidad de la formulación del líquido a temperatura ambiente. Desafortunadamente, el pH ácido tiene un efecto lateral adverso sobre la estructura, y probablemente sobre las propiedades de transporte en tejido de la albúmina sérica humana en esta formulación de la droga biológica. Variando el pH, la isomerización de la albúmina puede ser considerable así como también la configuración terciaria de la proteína albúmina y de sus propiedades físicas (ver Peters (1996). All About Albumin. Academia Press, New York;

55

56

incorporado aquí por referencia en su totalidad). Las alteraciones en las propiedades físicas (vía cambios en la unión de la toxina botulínica y en la dinámica de la liberación molecular de la toxina botulínica en los tejidos) se puede utilizar para explicar algunas de las considerables diferencias en los requerimientos de dosis comparando, en la práctica clínica, Botox® y MYOBLOC®. Con altos pH, se pueden ver efectos histológicamente similares de la formulación tipo B con unidades equivalentes de LD₅₀ (ver Borodic *et al* (1993) Botulinum B Toxin as an Alternative to Botulinum A Toxin, A Histological study. Ophthalmic Plastic and Reconstructive Surgery 9(3): 182-190).

Aunque, otras proteínas (e.g. gelatina, lactoalbúmina, lisozima), lípidos y carbohidratos pueden servir como agentes secuestrantes efectivos, albúmina, incluyendo albúmina encapsulada y microesferas sólidas es el agente secuestrante proteínico preferido, en parte, por su baja inmunogenicidad.

C. SECUESTRO.

El concepto de secuestro ha sido usado por el inventor para explicar la toxicidad alterada de la lidocaína cuando se dan inyecciones peri-oculares en ausencia de Wydase (Troll *et al* (1999). Diplopía después de la cirugía de catarata usando lidocaína al 4% en ausencia de Wydase™. Clin Anesth, 11(7):615-6). El secuestro en ausencia de Wydase, de lidocaína inyectable en estas circunstancias causa toxicidad de las miofibrillas de los músculos extraoculares con contracción cicatrizante y daño del movimiento extra-ocular. El ejemplo de la lidocaína indica como el secuestro de la difusión dinámica de un medicamento inyectable puede ser importante en la farmacología básica del medicamento.

Sin embargo, nunca ha habido sugerencia o recomendación que la albúmina pueda alterar la potencia de denervación regional o mejorar los efectos clínicos o

56

57

ser usada para tratar pacientes que no responden a BOTOX®, DYSPORT® o al MYOBLOC®. La presente invención proporciona composiciones y métodos que mejoran la efectividad clínica de fármacos de toxina botulínica.

Como se puntualizó anteriormente en la sección de potencia, el secuestro -la contención regional de la quimio-denervación- es una de las propiedades más importantes de las formulaciones de la presente invención. La propiedad es importante en el mejoramiento de la potencia, la reducción de la tasa de complicación de la difusión y la reducción de la anti-genicidad de la toxina botulínica. Las preparaciones que requieren dosis altas, es decir, administración de un aumento de carga proteínica están asociadas con altas tasas de inmunidad (comparando el lote Oculinum original 79-11 con el lote BOTOX® actual, MYOBLOC® comparado con BOTOX®. El mejoramiento del secuestro permite para bajas cargas de proteína, menos difusión, y mejoramiento del efecto biológico en la región blanco para el tratamiento. La utilidad de esta composición mejorada se demuestra por su efectividad terapéutica cuando las formulaciones convencionales (e.g., BOTOX®, MYOBLOC®) actualmente en uso fallan o dan resultados por debajo del óptimo.

D. Dosificación de formulaciones de toxina botulínica altas en albúmina

Se desea producir composiciones de toxina botulínica que requieran una cantidad efectiva baja para tratar una condición particular, por que la administración de toxina botulínica se ha asociado con el desarrollo de resistencia inmunológica. En consecuencia, esta complicación requiere aumentar la dosis (unidades LD₅₀ mayores) para lograr una cantidad efectiva terapéuticamente de la toxina botulínica.

Una composición de toxina botulínica derivada de la cepa Hall se formuló con una actividad específica de 20 unidades LD₅₀ / ng de toxina y 900 µg de albúmina

57

sérica humana a 100 unidades LD₅₀ de toxina botulínica (0.11 unidades LD₅₀ /μg de albúmina) (US FDA IND 4891). La indicación para terapia con esta nueva formulación fue una regeneración anormal del nervio facial con blefaroespasma sincinético involuntario. El estudio se realizó utilizando entre 5 y 15 unidades LD₅₀ de toxina botulínica Tipo A formulada con un aumento de la cantidad de albúmina al contenido de LD₅₀.

Tabla 5: Reducción de la cantidad efectiva de toxina botulínica utilizando composiciones de toxina botulínica altas en albúmina.

Ensayos Abiertos-marcados	15 pacientes cada una recibiendo 5-15 unidades LD₅₀	Se demostró 100 % de disminución del movimiento involuntario	Ninguna complicación de ptosis
Ensayos controlados de placebo doble- ciego	30 pacientes (relación 1:1 tratamiento/control), cada uno recibiendo 15 unidades LD ₅₀	1. Grado de movimientos involuntarios significativamente mejores que en los controles. 2. Parámetros subjetivos significativamente mejores que en los controles	Ninguna complicaciones de ptosis

La literatura anterior ha indicado que las preparaciones de BOTOX® existentes requieren 20 unidades LD₅₀ para lograr resultados favorables con esta indicación (Bodoric *et al.*, (1993) Botulinum Toxin for Aberrant Facial nerve regeneration. Dose response relationships. *Plastic and Reconstructive Surgery*, (91) 6:1042-1045. 1993). Además ha habido una incidencia de 20% de ptosis (una complicación de difusión) asociada con el uso de toxina botulínica para blefaroespasma involuntario, basado en un estudio de 100 pacientes con BOTOX® para el tratamiento de blefaroespasma y utilizando dosis comparables de LD₅₀ (ver, estudio aprobado de nuevo lote de Allergan Pharmaceuticals, 1998, incorporado aquí en su totalidad por referencia). Comparando la incidencia de esta complicación en un estudio con alta albúmina mostrado anteriormente con el

estudio de equivalencia de BOTOX® (19/99, comparado con 0/30, $P < 0.01$, Chi cuadrado, parece que la composición de toxina botulínica tipo A con alta albúmina requirió pocas unidades LD₅₀ para lograr resultados terapéuticos aceptables (la reducción en la cantidad efectiva de toxina) y se asoció con difusión limitada en la órbita la cual frecuentemente resulta en ptosis. La disminución en la incidencia de esta complicación indicó que el secuestro de los efectos de toxina botulínica se mejoró por el más alto contenido de albúmina.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos además sirven para ilustrar, la presente invención y no se construyen como limitantes de su alcance de ninguna manera.

Ejemplo 1: Tratamiento de blefaroespasma.

El individuo es una mujer de 52 años de edad con blefaroespasma involuntario bilateral severo. Los movimientos involuntarios le han impedido conducir y mantener un empleo lucrativo. Se le administró BOTOX® por inyección en cinco ocasiones separadas sin producir ninguna mejora significativa clínicamente. Se realizó una cirugía para remover una porción de los protractores del cierre del párpado (orbicularia oculii). No se observó mejoría permanente. Se cambió el contenido de albúmina del BOTOX® añadiendo 5,000 μg de albúmina sérica humana a un vial de BOTOX® (100 unidades LD₅₀). La composición resultante tiene una concentración de albúmina de 2,750 $\mu\text{g}/\text{cc}$ (0.018 LD₅₀/ μg de albúmina. La administración de 60 unidades LD₅₀ de una preparación con alta albúmina produjo una resolución cercanamente completa de los síntomas. La concentración de albúmina alta fue efectiva clínicamente aún cuando se usó en administraciones subsiguientes (4 ciclos de inyecciones) en dos años.

Ejemplo 2: Tratamiento de espasmo hemifacial.

El individuo es un hombre de 62 años de edad con una historia de espasmo hemi-facial bilateral. La terapia con toxina botulínica utilizando BOTOX® no fue efectiva. Los espasmos dañaron su funcionalidad diaria. Se intentó quirúrgicamente en dos oportunidades la descompresión del nervio facial. Ambas cirugías probaron ineffectividad en obtener alivio aceptable de los espasmos faciales involuntarios y le produjeron sordera en un oído. El contenido de albúmina del BOTOX® se aumentó adicionando albúmina sérica humana suficiente para alcanzar una concentración de 5,250 µg/cc (0,00952 LD₅₀/ µg de albúmina). La administración de 30 unidades de LD₅₀ de la preparación alta en albúmina probó alta efectividad y alivió sustancialmente los síntomas clínicos.

Ejemplo 3: Tratamiento del espasmo hemi-facial

El individuo es un hombre de 66 años de edad con espasmo hemi-facial derecho. Aunque él fue tratado exitosamente con BOTOX® durante 11 años, desarrolló resistencia que hizo además ineffectivas las inyecciones. Los ensayos de resistencia-resistencia, utilizando un punto de inyección remoto demostraron ausencia de anticuerpo circulante. Un ensayo de otra formulación de toxina botulínica, MYOBLOC®, tampoco fue efectivo en aliviar los signos y los síntomas.

El contenido del albúmina de BOTOX® se aumentó adicionando suficiente albúmina sérica humana para alcanzar una concentración de 5,250 µg/cc (0.00952 LD₅₀/ µg de albúmina). La administración de 40 unidades de LD₅₀ de la preparación alta en albúmina probó alta efectividad y alivió sustancialmente los síntomas clínicos.

Ejemplo 4: Tratamiento de blefaroespasmo esencial benigno

El individuo es un rector universitario de 72 años de edad, quien había sido diagnosticado con blefaroespasma esencial benigno. Cuatro inyecciones anteriores de la preparación del BOTOX® estándar fallaron en lograr cualquier mejoría significativa. El individuo se refirió para una posible remoción quirúrgica de músculo y nervio de los músculos débiles necesarios para el cierre del párpado. En su lugar se administró una preparación de toxina botulínica alta en albúmina en los sitios usuales de las inyecciones, que son específicos para blefaroespasma esencial benigno. La preparación alta en albúmina se produjo adicionando 12,250 $\mu\text{g/cc}$ (0.004 $\text{LD}_{50}/\mu\text{g}$ de albúmina. La administración de 60 unidades LD_{50} de la preparación alta en albúmina logró resultados excelentes donde la administración de la formulación convencional de BOTOX® había fallado. Tres meses después de la administración inicial de la preparación de toxina botulínica alta en albúmina se administró una preparación alta en albúmina de 40 unidades LD_{50} que comprende 25,000 μg de albúmina por 100 unidades LD_{50} (0.002 $\text{LD}_{50}/\mu\text{g}$ de albúmina) y produjo más de 80% de alivio de los síntomas clínicos de blefaroespasma.

Ejemplo 5: Tratamiento de blefaroespasma

El individuo es una mujer de 67 años de edad con blefaroespasma que no respondió a inyecciones de BOTOX®. La remoción quirúrgica de nervio y músculo falló en proporcionar cualquier alivio al cierre involuntario de los párpados.

Se adicionó albúmina a una preparación de BOTOX® convencional para producir una preparación de toxina botulínica alta en albúmina con una concentración de 50,250 μg de albúmina/cc (0.001 $\text{LD}_{50}/\mu\text{g}$ de albúmina). La inyección de 50 unidades de la preparación alta en albúmina produjo más de 50% de reducción de los síntomas.

Ejemplo 6: Tratamiento de blefaroespasma

El individuo es un hombre de 77 años de edad quien notó taquifilaxis después de inyecciones repetidas de toxina botulínica. Se inyectaron formulaciones convencionales de toxina botulínica tipo B sin alivio del blefaroespasma.

Se añadió albúmina sérica humana y 0.5 cc de Healon® (hialuronato) a 100 unidades LD₅₀ de toxina botulínica tipo A (BOTOX®). La preparación producida, alta en albúmina contenía 25,500 µg de albúmina por 100 unidades LD₅₀ (0.005 LD₅₀ /µg de albúmina). La administración de 60 unidades LD₅₀ redujo las contracciones involuntarias del párpado observadas clínicamente.

Ejemplo 7: Tratamiento de blefaroespasma esencial

El individuo era una mujer de 66 años de edad con blefaroespasma esencial. El tratamiento repetido con BOTOX® (tipo A) usando un intervalo de 40 a 300 unidades LD₅₀, no produjo beneficio terapéutico. Se administró toxina botulínica tipo B (MYOBLOC®) en una dosis de 10,000 unidades LD₅₀ en la región peri-ocular y también falló en producir cualquier alivio. También falló la neurectomía facial bilateral para producir cualquier alivio sustancial de los síntomas. Similarmente, no fueron efectivos procedimientos quirúrgicos adicionales para remover los músculos necesarios en el cierre del párpado.

Se adicionó albúmina sérica humana a 100 unidades LD₅₀ de toxina botulínica tipo A (BOTOX®). La preparación alta en albúmina producida contenía 12,750 µg de albúmina por 100 unidades LD₅₀ (0.00196 LD₅₀/ µg de albúmina). La administración de 50 unidades LD₅₀ produjo alivios sustanciales de los síntomas por un período de tres a cuatro meses mientras que otras formulaciones y aproximaciones quirúrgicas fallaron.

Ejemplo 8: Tratamiento de blefaroespasma crónico severo

 62

63

El individuo es un hombre de 83 años de edad con blefaroespasma crónico severo. El individuo había desarrollado ptosis, un efecto lateral de difusión después de repetidos tratamientos con dosis terapéuticas con formulaciones convencionales de toxina botulínica. La emergencia de la ptosis complicó el tratamiento de éste individuo al requerir dosis bajas de toxina botulínica. La baja dosificación probó menos efectividad. El paciente recibió una formulación de toxina botulínica alta en albúmina, que se produjo mezclando 25,000 µg de albúmina sérica humana con 100 unidades LD₅₀ de BOTOX®. La preparación alta en albúmina contenía 12,750 µg de albúmina por cc (0.004 LD₅₀/µg de albúmina). Usando la preparación alta en albúmina, se administraron 60 -70 unidades LD₅₀ con excelentes resultados clínicos y sin evidencias de ptosis después de la terapia. El mejoramiento del secuestro de concentraciones más altas de toxina botulínica deprimió la dispersión de la neurotoxina en los músculos en la cuenca del ojo.

Ejemplo 9: Tratamiento de blefaroespasma esencial

El individuo es una mujer de 67 años de edad con blefaroespasma esencial. El individuo estuvo bajo tratamiento con formulaciones convencionales de toxina botulínica sin alivio. Además, estos tratamientos produjeron ptosis.

Se administró al individuo una composición de toxina botulínica alta en albúmina (20,000 µg de albúmina/cc; 0.0025 LD₅₀ BOTOX®/ µg de albúmina), con una mejoría clínica del blefaroespasma y ninguna difusión relacionada con lo efectos laterales (ptosis).

Tabla 4. Comparación de concentraciones de albúmina usadas en los ejemplos 1-9 con otras formulaciones.

Ejemplo	Concentración de albúmina(µg/cc)	Preparación alta en albúmina (LD ₅₀ /µg albúmina/cc)	BOTOX® (LD ₅₀ /µg albúmina/cc)	DYSPORT® (LD ₅₀ /µg albúmina/cc)	MYOBLOC® (LD ₅₀ /µg albúmina/cc)
1	2,750	0.0180	0.2	5	10

63

64

2	5,250	0.0095	0.2	5	10
3	5,250	0.0095	0.2	5	10
4	12,500	0.0040	0.2	5	10
	25,000	0.0020			
5	50,250	0.0001	0.2	5	10
6*	10,200	0.0050	0.2	5	10
7	25,000	0.0020	0.2	5	10
8	12,500	0.0040	0.2	5	10
9	20,000	0.0025	0.2	5	10

*LD₅₀/mcg albúmina/cc para BOTOX®, DYSPORT®, MYOBLOC® dadas para comparación directa

Ejemplo 10: Preparación de una Composición de Toxina Botulínica alta en

Albúmina

Después de cuantificar el efecto biológico por dilución de toxina Botulínica purificada se adiciona al material liofilizado una cantidad de albúmina en cantidad suficiente para exceder 500 mg. por 100 LD₅₀. El aumento de albúmina se une a la toxina botulínica y mejora el secuestro de la neurotoxina inyectada proporcionando la mejor saturación de receptores de neurotoxina y mejorando el efecto clínico.

Ejemplo 11: Preparación de una composición de toxina Botulínica alta en albúmina que además comprende hialorunato

Después de cuantificar el efecto biológico por dilución de la toxina botulínica purificada, se adiciona una cantidad de albúmina al material liofilizado en cantidad suficiente para exceder 500 µg por 100 unidades LD₅₀. Adicionalmente, otro agente secuestrante, el cual además mejora el secuestro, se adiciona para contener la difusión de la neurotoxina botulínica hacia fuera de los sitios de inyección. Tal agente secuestrante se incluye pero no se limita a una solución diluida de hialuronato de sodio. El aumento de albúmina unida no covalentemente a la toxina botulínica y las mejoras en el secuestro de la neurotoxina proporcionan mejor saturación de los receptores de neurotoxina y, por consiguiente, una mejora en el efecto clínico.

69

Ejemplo 12: Preparación de una Composición de Toxina Botulínica alta en Albúmina que comprende además Colágeno.

Después de cuantificar el efecto de denervación de una neurotoxina botulínica por dilución de una toxina botulínica purificada, se mezcla albúmina con la neurotoxina botulínica liofilizada en cantidad suficiente para que exceda 500 μ g de albúmina por 100 unidades LD₅₀. Adicionalmente, otro agente físico, el cual además mejora el secuestro, se adiciona para preservar la neurotoxina botulínica de la difusión afuera del campo de la inyección. Tal agente sería una mezcla diluida de colágeno animal o humano. El aumento de albúmina que se une no covalentemente a la toxina botulínica y una mejora en el secuestro de la neurotoxina proporciona mejor saturación de los receptores de neurotoxina y mejoramiento del efecto clínico.

Ejemplo 13: Preparación de una composición de Toxina Botulínica alta en Albúmina que comprende proteína albúmina de fusión - Toxina Botulínica producida recombinantemente.

La toxina Botulínica se produce como una proteína de fusión con albúmina por lo cual se produce una molécula de albúmina que está enlazada covalentemente a una toxina botulínica. El bio-ensayo de ptosis de la denervación regional en conejo y bio-ensayo en el miembro posterior de ratón se pueden utilizar para confirmar la cantidad efectiva de una composición que comprende la proteína de fusión. Además se usaría un estudio a escala de la dosis clínica para confirmar y refinar la cantidad efectiva.

66

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende toxina botulínica y un agente secuestrante, en donde el agente secuestrante está presente en una cantidad entre 550 y 550,000 μg de agente secuestrante por 100 unidades LD_{50} de toxina botulínica.
2. La composición de la reivindicación 1, en donde el agente secuestrante esta presente en una cantidad entre 550 y 5,500 μg de agente secuestrante por 100 unidades LD_{50} de toxina botulínica.
3. La composición de la reivindicación 1, en donde el agente secuestrante está presente en una cantidad entre 5,500 y 13,500 μg de agente secuestrante por 100 unidades LD_{50} de toxina botulínica.
4. La composición de la reivindicación 1, en donde el agente secuestrante está presente en una cantidad entre 13,000 y 50,500 μg de agente secuestrante por 100 unidades LD_{50} de toxina botulínica.
5. La composición de la reivindicación 1, en donde el agente secuestrante está presente en una cantidad entre 50,500 y 505,000 μg de agente secuestrante por 100 unidades LD_{50} de toxina botulínica.
6. La composición de la reivindicación 1, en donde el agente secuestrante se formula como micro-esferas encapsuladas en una cantidad entre 50,500 y 90,500 μg de agente secuestrante por 100 unidades LD_{50} de toxina botulínica.

66

67

7. La composición de la reivindicación 1, en donde la toxina botulínica se selecciona del grupo que consiste de: toxina botulínica tipos: A, B, C, D, E, F, y G.
8. La composición de la reivindicación 7, en donde la toxina botulínica es toxina botulínica tipo A de la cepa Hall de *Clostridium botulinum*.
9. La composición de la reivindicación 1, en donde la toxina botulínica comprende la toxina botulínica de cadena liviana fraccionada.
10. La composición de la reivindicación 1, en donde la toxina botulínica esencialmente consiste de toxina botulínica de cadena liviana fraccionada.
11. La composición de la reivindicación 1, en donde la toxina botulínica esencialmente consiste de una mezcla de híbrido y formas traslocadas de la cadena de la toxina botulínica.
12. La composición de la reivindicación 1, en donde la toxina botulínica esencialmente consiste de formas quiméricas de la toxina botulínica.
13. La composición de la reivindicación 1, en donde la toxina botulínica tiene una actividad específica mayor que o igual a 20 unidades LD₅₀ por nanogramo de toxina botulínica.
14. La composición de la reivindicación 1, en donde la relación de unidades LD₅₀ de toxina botulínica a μ g de agente secuestrante es menor que o igual a 0.2 para la toxina botulínica tipo A.

67

68

15. La composición de la reivindicación 1, en donde la relación de unidades LD₅₀ de toxina botulínica a μ g de agente secuestrante es menor que o igual a 10 para la toxina botulínica tipo B.

16. La composición de la reivindicación 1, que comprende además un vehículo aceptable farmacéuticamente.

17. La composición de la reivindicación 1, en donde la toxina botulínica está unida no covalentemente al agente secuestrante.

18. La composición de la reivindicación 1, en donde la toxina botulínica está unida covalentemente al agente secuestrante.

19. La composición de la reivindicación 1, que comprende además zinc o sales de zinc.

20. La composición de la reivindicación 1, en donde el agente secuestrante es albúmina.

21. La composición de la reivindicación 1, en donde la albúmina está presente en una cantidad entre 550 y 5,500 μ g de albúmina por 100 unidades LD₅₀ de toxina botulínica.

22. La composición de la reivindicación 1, en donde la albúmina está presente en una cantidad entre 5,500 y 13,000 μ g de albúmina por 100 unidades LD₅₀ de toxina botulínica.

23. La composición de la reivindicación 1, en donde la albúmina está presente en una cantidad entre 13,000 y 50,500 μ g de albúmina por 100 unidades LD₅₀ de toxina botulínica.

68

24. La composición de la reivindicación 1, en donde la albúmina está presente en una cantidad entre 50,500 y 505,000 μg de albúmina por 100 unidades LD_{50} de toxina botulínica.

25. La composición de la reivindicación 1, en donde la albúmina está formulada como micro-esferas encapsuladas en una cantidad entre 50,500 y 90,500 μg de albúmina por 100 unidades LD_{50} de toxina botulínica.

26. La composición de la reivindicación 1, en donde la albúmina está formulada como una partícula de albúmina sólida.

27. La composición de la reivindicación 1, en donde la albúmina se produce recombinantemente.

28. La composición de la reivindicación 20, que además comprende uno o más agentes secuestrantes adicionales.

29. La composición de la reivindicación 1, en donde el agente secuestrante se selecciona del grupo que consiste de: proteínas, lípidos y carbohidratos.

30. La composición de la reivindicación 29, en donde el agente secuestrante es colágeno.

31. La composición de la reivindicación 29, en donde el agente secuestrante es hialuronato.

32. La composición de la reivindicación 29, en donde el agente secuestrante es epinefrina.

70

33. Un método de denervación localizada en un individuo en necesidad de éste, que comprende administrar una cantidad efectiva de la composición de la reivindicación 1.
34. El método de la reivindicación 33, en donde el individuo sufre de una enfermedad neuromuscular asociada con tono muscular aumentado o movimiento involuntario.
35. El método de la reivindicación 34, en donde la enfermedad neuromuscular asociada con tono muscular aumentado con movimiento involuntario es blefaroespasma o tortícolis.
36. El método de la reivindicación 35, en donde la enfermedad neuromuscular asociada con tono muscular aumentado con movimiento involuntario es blefaroespasma.
37. El método de la reivindicación 36, en donde la cantidad efectiva está entre 10-200 unidades LD₅₀.
38. El método de la reivindicación 35, en donde la enfermedad neuromuscular asociada con el aumento del tono muscular con movimiento involuntario es tortícolis.
39. El método de la reivindicación 38, en donde la cantidad efectiva está entre 10-3000 unidades LD₅₀.
40. Un método para tratar una condición seleccionada del grupo que consiste de arrugas faciales, rhytides y alteración cosmética de labio y ceja en un individuo con necesidad de éste que comprende la administración de una cantidad efectiva de la composición de la reivindicación 1.

70

71

41. El método de la reivindicación 40, en donde la cantidad efectiva está entre 2.5 y 400 unidades LD₅₀.

42. Un método para tratar desórdenes de dolor de cabeza humano en un individuo con necesidad de él, que comprende la administración de una cantidad efectiva de la composición de la reivindicación 1.

43. El método de la reivindicación 42, en donde la cantidad efectiva está entre 5 y 1,000 unidades LD₅₀.

44. Un método para tratar desórdenes de dolor de cabeza de migraña en humanos en un individuo con necesidad de él, que comprende la administración de una cantidad efectiva de la composición de la reivindicación 1.

45. El método de la reivindicación 44, en donde la cantidad efectiva está entre 5 y 1,000 unidades LD₅₀.

46. Un método para tratar las condiciones inflamatorias humanas en un individuo con necesidad de él, que comprende la administración de una cantidad efectiva de la composición de la reivindicación 1.

47. El método de la reivindicación 46, en donde la cantidad efectiva está entre 5 y 4,000 unidades LD₅₀.

48. Un método para tratar el dolor neuropático o miopático en un individuo con necesidad de él, que comprende la administración de una cantidad efectiva de la composición de la reivindicación 1.

2

72

49. El método de la reivindicación 48, en donde la cantidad efectiva está entre 5 y 4,000 unidades LD₅₀.

50. Un método para tratar el dolor de espalda o el dolor artrítico en un individuo con necesidad de él, que comprende la administración de una cantidad efectiva de la composición de la reivindicación 1.

51. El método de la reivindicación 50, en donde la cantidad efectiva está entre 5 y 4,000 unidades LD₅₀.

52. Un método para tratar el espasmo gastrointestinal y constricciones en un individuo con necesidad de él, que comprende la administración de una cantidad efectiva de la composición de la reivindicación 1.

53. El método de la reivindicación 52, en donde la cantidad efectiva está entre 5 y 4,000 unidades LD₅₀.

54. Un método para tratar el síndrome de hiperhidrosis en un individuo con necesidad de él, que comprende la administración de la composición de la reivindicación 1.

55. El método de la reivindicación 54, en donde la cantidad efectiva está entre 5 y 4,000 unidades LD₅₀.

56. Un método de producción de la composición de la reivindicación 1, que comprende mezclar albúmina con toxina botulínica en una relación peso a peso, que excede de 100 µg de albúmina por un ng de toxina botulínica.

57. Un método de producción de la composición de la reivindicación 1, que comprende secar por congelación o secar por flash, una mezcla de una

72

73

toxina botulínica y albúmina en una relación peso a peso, 100 μ g de albúmina por un ng de toxina botulínica.

58. Un método de producción de la composición de la reivindicación 1, que comprende la liofilización de una mezcla de una toxina botulínica y albúmina en una relación peso a peso, de 100 μ g por un ng de toxina botulínica.

59. Una composición que comprende toxina botulínica y un agente secuestrante, en donde al agente secuestrante está presente en una cantidad entre 550 y 900,500 μ g de agente secuestrante por 100 unidades LD₅₀ de toxina botulínica.

60. La composición de la reivindicación 59, en donde la albúmina se formula como una partícula de albúmina sólida.

73

74

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION	()	()
Indicacion de que se solicita la concesion de una patente.	()	()
Datos de identificacion del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
Descripcion de la invencion.	()	()
Dibujos de ser estos pertinentes.	()	()
Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()

COMPLETA ()

INCOMPLETA () ()

DISEÑO INDUSTRIAL ()

- Indicacion de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
- Datos de identificacion del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.	()	()
- Representacion grafica o fotografica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño.	()	()
Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()

COMPLETA ()

INCOMPLETA () ()

ESQUEMA DE TRAZADO ()

- Indicacion de que solicita el registro de un Esquema de trazado.	()	()
- Datos de Identificacion del solicitante o de la persona que presenta La solicitud.	()	()
Representacion grafica del esquema de trazado	()	()
Comprobante de pago de las tasas establecidas.	()	()

COMPLETA ()

INCOMPLETA () ()

Firma Responsable:

Fecha:

[Handwritten signature]
[Handwritten date: 17 de 2005]

75

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
CARDENAS NAVAS DARIO

REFERENCIA	Radicación No.	5 59213
	Solicitud internacional	IB/2003/006145
	Fecha inicio fase nacional	20/07/2005
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	9202

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. Si fuere el caso, el solicitante debe adjuntar la traducción de los anexos del reporte de examen preliminar internacional (Art. 36.2.b) del tratado PCT.
2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.
3. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 07 OCT. 2005
adpal

